



TITLE:

天然水に溶存する生理活性有機化合物の捕集と同定法の開発に関する研究

AUTHOR(S):

堀, 智孝

CITATION:

堀, 智孝. 天然水に溶存する生理活性有機化合物の捕集と同定法の開発に関する研究. 2006

ISSUE DATE:

2006-06

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/84869>

RIGHT:

天然水に溶存する生理活性有機化合物の捕集と同定法の
開発に関する研究

1 5 5 0 0 6 9

平成 1 5 年度～平成 1 7 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書



平成 1 8 年 6 月

研究代表者 堀 智 孝

京都大学大学院人間・環境学研究科教授

天然水に溶存する生理活性有機化合物の捕集と同定法の
開発に関する研究

1 5 5 0 0 6 9

平成 1 5 年度～平成 1 7 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成 1 8 年 6 月

研究代表者 堀 智 孝

京都大学大学院人間・環境学研究科教授

<はしがき>

本報告書は、平成15年度から平成17年度にわたって文部省科学研究費補助金（基盤研究(C)）を得て行った研究「天然水に溶存する生理活性有機化合物の捕集と同定法の開発に関する研究」（課題番号1550069）の成果をまとめたものである。

今日までに人類が合成した有機化合物は100万種に達し、今後も、毎年10万種ずつ新しいものが加わると推計されている。食品添加物、残留性の強い農薬、発ガン性物質などの一群の化合物については厳しい管理システムの完成が焦眉の急であるが、生理活性有機物の捕集に適した吸着剤を、対象とする有機化合物の性状にあわせて、自由に選択できる状態からは程遠いのが現状である。目下、吸着剤の基質選択性、吸着の可逆性、共存塩の影響を keywords にして、「新しい吸着系」の発見に向けての研究が精力的にすすめられている。この一環として、本研究は水酸化鉄吸着剤の特性に注視したものである。

研 究 組 織

研究代表者：堀 智孝（京都大学大学院人間・環境学研究科教授）

研究分担者：杉山雅人（京都大学大学院人間・環境学研究科教授）

研究分担者：高橋弘樹（京都大学大学院人間・環境学研究科助手）

（研究協力者：杉山裕子 兵庫県立大学助手）

（研究協力者：長井正博 人間環境大学助教授）

（研究協力者：越川昌美 独立行政法人国立環境研究所主任研究員）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
平成15年度	2,800,000	0	2,800,000
平成16年度	500,000	0	500,000
平成17年度	500,000	0	500,000
総 計	3,800,000	0	3,800,000

研究発表

(1) 学会誌等

M. Nagai, M. Sugiyama, and T. Hori, Sensitive Spectrophotometric Determination of Phosphate Using Silica-Gel Collectors, *Anal. Sci.*, 20, 2004.

(2) 口頭発表

(i) H. Takahashi, K. Morimoto, and T. Hori, Collection and Identification of Bioactive Organic Compounds Occurring in Rivers and Lakes: Adsorption Selectivity of Monosaccharides onto Hydrous Metal Oxides, *International Conference of Analytical Chemistry and Chemical Analysis (AC&CA-05)*, Kiev Ukrain, Sept. 2005.

(ii) T. Hori, M. Sugiyama, and H. Takahashi, Phosphate Analyses for Environmental Chemistry, *International Conference of Analytical Chemistry and Chemical Analysis (AC&CA-05)*, Kiev Ukrain, Sept. 2005.

(3) 出版物

藤永太一郎監修、宗林由樹・一色健司編、海と湖の化学
—微量元素で探る—、京都大学学術出版会、平成17年3月

研 究 成 果

水酸化鉄を主体とする吸着法あるいは水酸化鉄共沈法は、これまでに海水中の微量元素の定量法の基礎を確立したが、その後、この成果は環境汚染物質とりわけ微量重金属元素の定量法に援用されて、今日では環境化学の基礎を成すものとなっている。最近、著者らは水酸化鉄吸着材が Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cr^{3+} 等々といった無機金属元素に限らず、広く PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} といった無機陰イオンを始め多数の有機リン化合物やカルボン酸とその誘導体を効率良く吸着することを見出した。すなわち、水酸化鉄吸着法の適用がこれまでの無機化合物に限られることなく、多様な有機化合物の吸着捕集剤となるとの示唆を得るに至った。本研究は、各種有機化合物に対する水酸化鉄吸着体の特色を具体的に示し、その分離化学への応用を目指したものである。

極希薄な濃度で天然水中に溶存する各種生理活性有機化合物を、効率良く吸着捕集して、それらを同定定量する方法の確立を目指して、本研究では、まず、生理活性基として糖類、カルボン酸類、各種リン化合物を取り上げ、これら一群の天然および合成有機化合物の水酸化鉄吸着剤に対する吸着特性を系統的に測定した。

将来は、この基礎研究の成果を援用して、有機物質による水圏の汚染を除去する方法や、食品に混入するいわゆる環境ホルモンと称される有機物の簡便な検出定量法の確立につなげたい。

本研究の成果を第1～4章に述べる。

第1章は、水酸化ジルコンと水酸化鉄に対する単糖類の吸着性を、ラングミュア定数を用いて定量的に比較し、定数の大小を糖の分子構造を基にして考察したものである。

第2章では、34種のカルボン酸を取り上げ、(i)カルボン酸分子中のカルボキシル基の数、(ii)カルボキシル基の置換位置、(iii)カルボキシル基に隣接するカルボキシル基以外の

置換基が、水酸化鉄への吸着を支配する様子を体系的に論じた。

第3章は、13種のリン化合物を比較した結果であって、水酸化鉄に吸着されるには、リン化合物分子中に少なくとも2個以上の遊離のP-O基が必要であるとの結論を得た。

また、吸着捕集されたリン化合物のHPLC法による同定を試みた。

第4章は、水酸化鉄とケイ酸ゲルの複合吸着剤の効果を調べたものである。ケイ酸ゲルが吸着基材として働くので、水酸化鉄の必要量を極限まで低下させることが可能となり、鉄の妨害を受けることなくリン酸の定量できることが解った。

以下は、その詳細である。

第1章 水酸化ジルコンおよび水酸化鉄沈殿に対する単糖類の吸着について

(堀 智孝・越川昌美)

単糖の分子構造を精度よく識別することが免疫反応の基本であり、そこでは生体膜表面に存在する糖鎖の配列が蛋白質によって識別される[1]。それぞれの単糖分子は複数の水酸基をもち、それらの特異的な立体配座が蛋白質によって識別されると考えられている。しかし無機化学的、物理化学的には、単糖類の性質は互いによく似通っており、酸解離定数 (pK_a) はいずれも 12 近くに集中している。このことから実験室で単糖を相互に分離する際には、ホウ酸[2] やカルシウムイオン[3]との錯生成の僅かな違いや、水相と有機ポリマー相との間の微細な分配比の違いが利用されることになる。

近年、金属酸化物の表面が構造の似通った有機分子を区別することが分かってきた。この原理に沿って、天然水に低濃度で溶存する有機物を定量可能な濃度レベルまで濃縮する方法が研究されている。また、金属酸化物よりもその金属の水酸化物（水和金属酸化物）は高い吸着能をもち、有機物の吸着捕集に効果的であることが分かっている。例えば、水酸化ジルコニウム (HZO) を吸着剤に用いると、水酸基をもつ芳香族化合物の *o*-、*m*- および *p*- 異性体が区別され、カテコール、フタル酸、サリチル酸の *o*-置換体がその他の置換体に優先して吸着される[4]。水酸化鉄(HIO)についても同様であって、Davies[5] はグルタミン酸、*o*-ヒドロキシ安息香酸、2, 4-ジヒドロキシ安息香酸の吸着を詳しく比較している。青木らは、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、フェニルアラニン、リシンのように、酸性から中性ならびに塩基性におよぶアミノ酸を取り上げ、それらがHIO吸着における最適 pH 領域を精査した[6]。堀らは、HIO に対する各種有機リン化合物[7] およびカルボン酸[8] の吸着曲線を定量的に比較し、その結果、吸着される分子の官能基の数と官能基の置換位置が吸着率を支配することを見いだした。

単糖類の吸着についての研究は少ない。横井[9] は HIO による単糖の“除去率”(removability) を測定し、それが顕著に立体選択的であると述べたが、この選択性が何

に基づくかについて詳しいことはまだわかっていない。もし、単糖類の吸着挙動が相互に少しでも異なれば、その違いは単糖分子の立体構造の特徴に基づいて解釈することが期待される。なぜなら、単糖はほとんどイオンに解離しないため、HZO や HIO の表面に対する静電的な吸着はおこらないからである。

本章は、分子構造の違いを考慮して 18 種の単糖を選び出し、これらが HZO および HIO に吸着する様子を ラングミュア吸着等温式をもとにして系統的に比較し、その結果を単糖の分子構造に関係づける試みを行ったものである。

実 験

[試 薬]

実験に用いた単糖類とその誘導体は以下のとおりである (図 1)。アルドヘキソースを代表して D-glucose(1)、D-mannose(2) および D-galactose(3); アルドペントースを代表して D-ribose(4)、L-ribose(5)、D-arabinose(6) および D-xylose(7); ケトヘキソースとして D-sorbose(8)、L-sorbose(9) および D-fructose(10); デオキシ糖として 2-deoxy-D-glucose(11)、2-deoxy-D-ribose(12) および D-fucose(13); メトキシ糖として、3-O-methyl-D-glucose(14) および α -methyl-D-glucoside (15); 環状構造のみをとる糖として、(15) および D-sucrose(16); 鎖状構造のみをとる糖として、D-mannitol(17) および D-glyceraldehyde(18)。これらはすべて市販されており、市販品をそのまま用いて 20 mmol/dm³ のストック溶液を調整した。これらのストック溶液は全有機炭素濃度をシュウ酸標準溶液と比較して濃度を確認し、4℃で冷蔵保存した。

[吸着剤 (HZO と HIO 懸濁液) の調製]

ZrOCl₂ · 8H₂O (0.580 g、1.8 mmol) を含む水溶液 (25 cm³) を 2 mol/dm³ NH₃ (10 cm³) と激しく攪拌しながら混合し、生成した沈殿を蒸留水 (30 cm³) で 5 回洗浄した

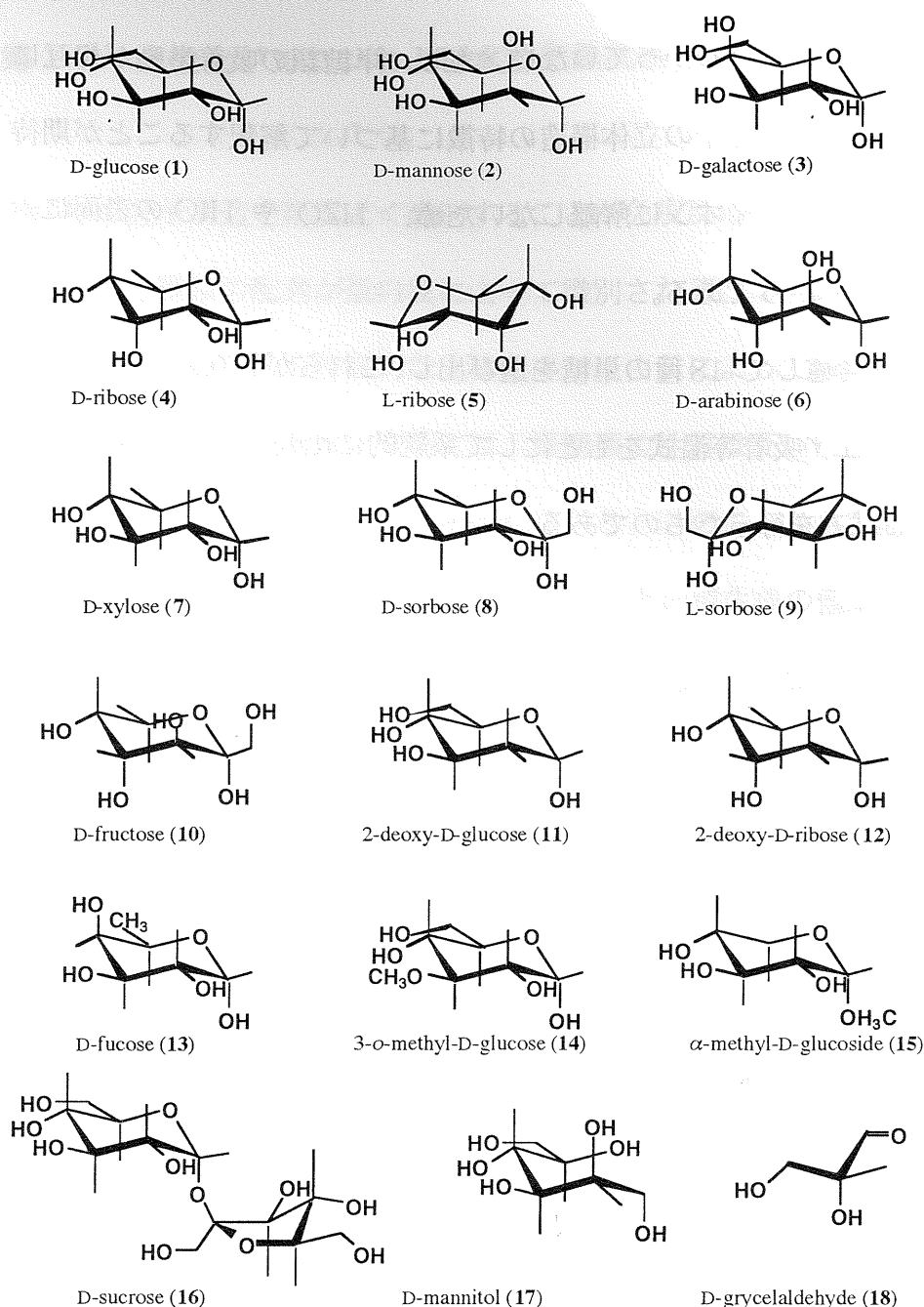


図 1 本研究で用いた糖類の分子構造（本文中では、カッコ内の太数字を用いて各糖を表記した。）

のち、純水に懸濁させて、その全量を 25 cm^3 にした。この HZO 懸濁液は、アモルファス状態を保証するために、使用の直前にその都度新しく調製した。同様にして HIO 懸濁液は、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2.43 g, 9.0 mmol) と $1 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$ の混合溶液 (5 cm^3) と $2 \text{ mol/dm}^3 \text{ NH}_3$ 水 (15 cm^3) を混和して調製した。

[吸着実験]

約 10 cm^3 の水を入れたガラスバイアルに各単糖のストック溶液の所定量 ($0.9 \sim 4.5\text{ cm}^3$) をとり、これに 3 cm^3 の HZO 懸濁液 (Zr として 0.216 mmol) を加え、水で 20 cm^3 に希釈した。体積を無視しうる程度に少量の HCl または NaOH を加えて溶液の pH を $6 \sim 8$ に調整した。 25°C で 24 h 振とうして吸着平衡に達した溶液を Nuclepore filter® (孔径 $0.4\text{ }\mu\text{m}$) でろ過し、このろ液について、単糖の平衡濃度 ($C\text{ mmol/dm}^3$) および pH を測定した。糖 **1**~**16** の定量はアンスロン-硫酸法[10] で、糖 **17** の定量は Shiseido Capcel Pak NH_2 -80 ($25\text{ cm} \times 4.6\text{ mm i.d.}$) を分離カラム、75% アセトニトリル水溶液を溶離液、示差屈折率計 (Shodex SE-51) を検出器として用いた高速液体クロマトグラフ法で、糖 **18** の定量は 全有機炭素測定装置 (Shimadzu TOC-5000) で行った。HZO 1 mol 当たりに吸着した単糖の量を、初濃度、吸着後の平衡濃度、および HZO の量 (特記しないかぎり 0.216 mmol) から算出し、これを用いて ラングミュア吸着等温線を描いた。

以上の操作を HIO についても同様に行った。

結果と考察

[ラングミュア定数 a および W_s の算出]

D-グルコースのラングミュアプロットを図 2 に示した。図 2a は、平衡濃度 C (mmol/dm^3) に対する HZO 1 mol 当たりに吸着した糖の量 W (mol/mol) の関係を示したものであり、図 2b は $1/W$ を $1/C$ に対してプロットしたものである。なお、吸着反応の可逆性は、HZO に吸着させた糖 **4** および **7** を用いて確認した。すなわち、吸着平衡に達した試料を遠沈して上澄み液を捨てた後、HZO 沈殿に蒸留水 20 ml を加えた。この懸濁液

を5時間振とうして2度目の吸着平衡に達した試料の $1/W$ および $1/C$ を求めたところ、実験誤差の範囲で1回目の平衡におけるラングミュアプロットと一致した。

二つのラングミュア定数、すなわち、HZO 表面の吸着サイトの吸着平衡 a および HZO 表面に均質な単分子層を形成する場合の最大吸着量 W_s は、ラングミュアの吸着等温式

$$1/W = [1/(a \cdot W_s)](1/C) + 1/W_s \quad (1)$$

に基づいて、図 2b の回帰直線の切片と傾きから算出した。

以上の吸着実験と解析をその他の 17 種の単糖について同様に行い、その結果を表 1 にまとめた。この表には、吸着剤を HZO から HIO に変えた場合の結果を併せて掲げている。

[糖分子の水酸基の立体配置とラングミュア定数 a の大きさの関係]

一群のアルドヘキソースの間で ラングミュア定数 “ a ” を比較した。一对のエピマー **1** と **2** の “ a ” はそれぞれ 7 と 17 であって、相互に区別されることがわかった。すなわち C(2) 炭素上の水酸基 O (2) の立体配置の違いが ZIO への吸着に際して示差されたことになる。全く同様にして一对のエピマー **1** と **3** の “ a ” に有意な差があって、水酸基 O(4) の立体配置の違いが認識されることがわかる。

アルドペントース **4** ~ **7** の間で、同様に “ a ” を比べた。HZO 表面に光学活性がないことから予想されるとおり、一对の鏡像異性体 **4** と **5** の間で “ a ” には有意な違いはなく (37 ± 5 および 35.0 ± 0.7)、両者は相互に区別されないことがわかった。しかし、一对のエピマー **4** と **6** は互いに区別されるので水酸基 HO(2) の関与が、また別のエピマー **4** と **7** も相互に区別されるので、水酸基 HO(3)の関与が大きいことが分かる。これらの結果から、アルドヘキソースおよびアルドペントースの HZO への吸着には、水酸基 HO (2)、HO(3)、HO(4) の立体配置が大きく関与することが分かる。

次に、ケトヘキソース **8** ~ **10** の間で “ a ” を比べた。一对の鏡像異性体 (**8** と **9**)

は区別されなかったが、互いに立体異性体である **8** と **10** の HO(3) および HO(4) の立体配置の違いは区別された。

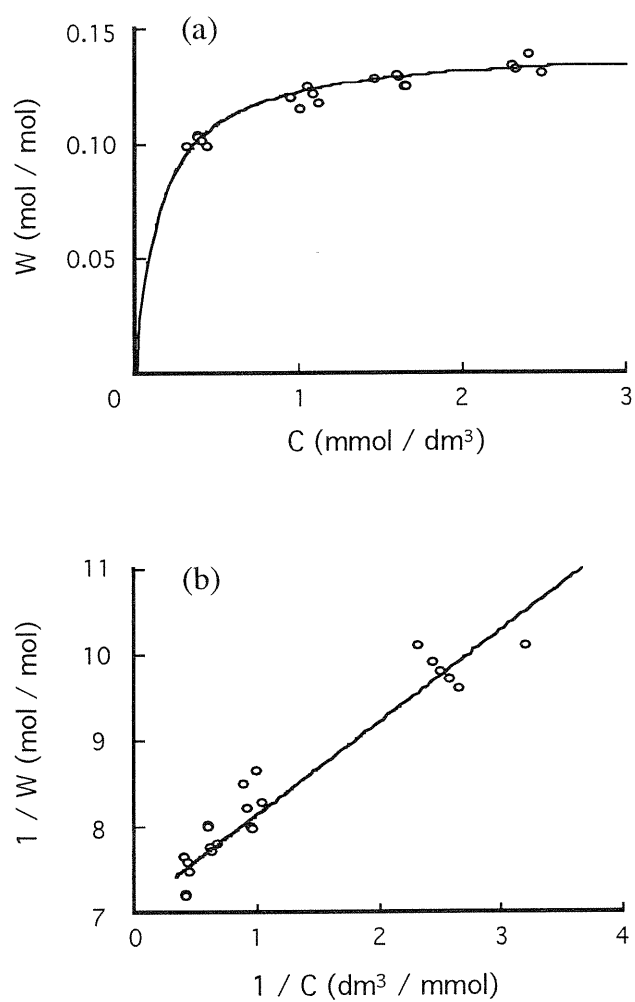


図 2 水和酸化ジルコン(HZO)にグルコース(1)が吸着する場合のラングミュア等温吸着曲線。
(a): W vs. C プロット; (b): $1/W$ vs. $1/C$ プロット.

表 1. ラングミュアー等温吸着式から求めた定数 W_s と a の値をまとめたもの。吸着剤には、水酸化ジルコン (HZO) と水酸化鉄 (HIO) を用い、18 種の糖 (**1** ~ **18**) の吸着特性を調べた。糖の初期濃度: 0.9 ~ 4.5 mmol.dm³; 吸着剤 (HZO、HIO) の量: 0.216 mmol; 試料の全容量: 20 cm³; 温度: 25.0 °C。この表には、各糖の分子構造から計算によって求まる数値 (本文参照)、 N_{CONF} 、 N_{TCSC} 、ならびに $R = N_{\text{CONF}}/N_{\text{TCSC}}$ を併せて示した。

糖	HZO		HIO		N_{CONF} N_{TCSC}		R $= N_{\text{TCSC}} / N_{\text{CONF}}$
	W_s (mol/mol)	a (dm ³ /mol)	W_s (mol/mol)	a (dm ³ /mol)			
1	0.140±0.003	7.0±0.8	0.030±0.007	1.0±0.2	12	3	0.25
2	0.150±0.002	17±2	0.05±0.01	1.0±0.9	12	6	0.50
3	0.150±0.002	18±1	0.05±0.02	1.0±0.2	12	5	0.42
4	0.210±0.003	37±5	0.100±0.009	3.0±0.7	4	4	1.0
5	0.210±0.001	35.0±0.7	0.08±0.01	4±2	4	4	1.0
6	0.19±0.03	7±3	0.04±0.02	2±2	4	1	0.25
7	0.170±0.005	10±2	0.04±0.02	2±1	4	1	0.25
8	0.170±0.007	13±3	0.07±0.01	3±1	12	9	0.75
9	0.170±0.005	14±4	0.060±0.007	3.0±0.6	12	9	0.75
10	0.190±0.004	23±3	0.060±0.008	3.0±0.7	12	10	0.83
11	0.100±0.005	4.0±0.5	—	—	12	0	0
12	0.090±0.004	3.0±0.3	—	—	12	0	0
13	0.130±0.005	8±2			12	3	0.25
14	0.110±0.008	3.0±0.5	—	—	12	3	0.25
15	0.070±0.008	1.0±0.2	—	—	6	0	0
16	0.080±0.005	4.0±0.8			6	0	0
17	0.160±0.007	16±3			*	*	*
18	0.3±0.1	8±3			*	*	*

— 吸着が起こらなかった

*ピラノース型は存在しない

同様の置換を糖 **4** について行った。未置換の糖 **4** の “*a*” は 37 であるが、水酸基 O(2) をデオキシ化した糖 **12** の “*a*” は 3 に減少した。このように水酸基 O(2) が糖 **4** の吸着で重要であることを再度確かめることができる。

同様に、糖 **1** を **7** と、糖 **3** を **13** と比較するとことにより、糖 **1** の HO(6)CH₂-基および糖 **3** の HO(6) 基の関与を判定した。その結果、糖 **1** の HO(6)CH₂-基を除いた場合には “*a*” が 7 (糖 **1**) から 10 (糖 **7**) までわずかに増加したのに対して、糖 **3** の HO(6) 基を除いた場合には、18 (糖 **3**) から 8 (糖 **13**) まで大きく減少した。この二つの結果は一見すると矛盾するようであるが、HO(6)が糖の吸着に影響を与えていることは確かである。糖 **1** の HO(6)CH₂-基を除くと、HO(6)が無くなった分だけ吸着が弱くなるという負の効果が予想されるが、O(5)、O(1)、O(2)の三つの酸素が同時に吸着に関与する場合の HO(6)CH₂-基による立体障害が無くなるという正の効果が勝っていたと考えられる。

アルドースの水酸基 O(2)、O(3)、O(4) ならびにケトースの水酸基 O(3)、O(4)、O(5) の立体配座に注目しながら、再度、表 1 中の “*a*” の大きさを詳しく比較すると次のことが分かる。表 1 の中でもっとも大きな *a* を示すのは糖 **4** および **5** であって、ここでの水酸基 HO(2)、HO(3)、HO(4) は *ax-eq-ax* の配座である。つぎに大きな “*a*” を示すのは糖 **10** であって、水酸基 HO(3)、HO(4)、HO(5)は、*ax-eq-eq* の配座である。他方、未置換の糖 **1** ~ **10** の中で、もっとも小さな “*a*” を示すのは、糖 **1** であって、水酸基 HO(2)、HO(3)、HO(4)の配座は *eq-eq-eq* である。また、置換されている糖 **11**、**12**、**14**、すなわち HO(2)、HO(3)、HO(4)のうちの一つが H-基又は CH₃O-基と置換されている糖は、 $3 \leq a \leq 4$ の狭い範囲内で相互に “*a*” が似通っており、しかもこの値は未置換の糖 **1** の “*a*” より小さかった。

このように、互いに隣接する三つの水酸基、すなわち、アルドースの HO(2)、HO(3)、HO(4) とケトースの HO(3)、HO(4)、HO(5)の立体配座を “*a*” が大きい順に並べると、

$ax-eq-ax > ax-eq-eq > eq-eq-eq > *-eq-eq$ (または $*-eq-ax$ あるいは $eq-*eq$) となる。ここで、* 印は水酸基が H- あるいは CH_3O- 基に置換されていることを示す。この序列は、Angyal *et al.* [11, 12] が電気泳動法を用いて測定した Ca(II) イオンと糖 (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10 およびアロース) の錯生成の強さの序列と一致している。彼らは、糖 4 およびアロースの錯生成が最も強く、2, 3, 4 及び 10 が弱く、残りの糖の錯生成がさらに弱いことを示し、「 $ax-eq-ax$ 配列の水酸基をもつ糖は強く錯生成する」と結論した。

[糖分子の幾何学的特徴に基づいた "a" の解釈]

本論文で検討した 18 種の糖の中で、糖 4 および 5 は最大の "a" を与えることがはっきりした。図 3 の囲みの中に、糖 4 の HO(2)、HO(3)、HO(4) の水酸基の $ax-eq-ax$ 配座を描いた。この図に描いたように、これら三つの水酸基の酸素原子は空間的にもっとも接近していて、三角形 O(2) - O(3) - O(4) は半径 $1.6 \pm 0.2 \text{ \AA}$ の円に内接することが分かる。この外接円の半径 r は、三角形の三辺の長さを、 l_1 [辺 O(2) - O(3)] = 3.0 \AA 、 l_2 [辺 O(3) - O(4)] = 3.0 \AA 、 l_3 [辺 O(4) - O(2)] = 2.8 \AA として、次式

$$r = l_1 / [2 \{ 1 - [(l_2^2 + l_3^2 - l_1^2) / 2 l_2 l_3]^2 \}^{1/2}] \quad (2)$$

から計算したものである。

辺の長さを求める際に、球と棒型の分子模型 [糖分子の C-C 及び C-O の結合距離をそれぞれ 1.54 \AA および 1.45 \AA 、また、 $C-C-C$ と $C-O-C$ の結合角はともに 109.5° とした分子模型 (日ノ本合成樹脂製作所、東京; HGS 模型)] を使用した。HGS 模型で求めた原子間距離と結晶学的データ (文献 13) を比較すると、よく一致することがわかる。

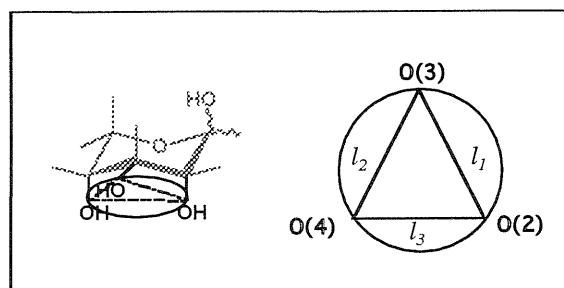
上記の 3 辺の長さをもつ三角形は、糖の三つの水酸基がつくる三角形のなかで最小の外接円を持ち、様々な糖の構造から三つの酸素原子の特定の立体配座を探す際に有用である。

ちなみに、最小の外接円を持つ三角形 (TCSC, the triangle circumscribed by the

smallest circle と呼ぶことにする) を、二番目に小さい外接円をもつ三角形と比べると、その外接円半径 r ($1.6 \pm 0.2 \text{ \AA}$ および $2.1 \pm 0.2 \text{ \AA}$) が明確に異なることから、相互に区別することができる。

図 3a~d に示すように、糖 **4** には四つのコンフォメーションが可能である。すなわち、HO(1) の立体配座に応じて 1 組の α - および β -アノマーが存在し、各々のアノマーの椅子型配座には、椅子の形状が区別される 1 組のコンフォーマー、C1- (4C_1 , normal) と 1C- (1C_4 , alternative) 、が存在する。HGS 分子模型を用いてこれらを再現し、TCSC を目視で探した。糖 **4** について言えば、破線で示すように、コンフォメーション(a)に二つの TCSC が見つかり、コンフォメーション (b)および(c)に一つずつ TCSC があり、コンフォメーション (d)には TCSC がない。ここで、この四つの TCSC が同じ重みでラングミュアの吸着平衡定数 a を増加させる作用をもつと仮定する。

さらに一般的には、以下の方法で、HGS 分子模型を使って糖の幾何学的構造を再現し、TCSC の数を数えた。図 4 に示すように、糖 **1** には 12 個のコンフォメーションが考えられる。すなわち、(i) 1 組の α - および β -アノマー；(ii) 各々のアノマーの椅子型配座に対して、椅子の形状が区別される 1 組の C1- および 1C-コンフォーマー；(iii) 各々のコンフォーマーに対して、C(5) - C(6)炭素間結合が自由回転することから、三つずつの staggered 配座 (scheme 1) が可能となる。以上の (i) ~ (iii) の要因から、糖 **1** には総計 12 個の互いに区別される配座異性体 (この数を N_{SI} とする) が可能となる。これらを分子模型で再現して、スケッチしたものを 図 4 a~l に示した。これら 12 個のモデルを目視して、互いに隣接する三つ 1 組の酸素原子を捜し出し、これらが形成する三角形の外接円の半径が $1.6 \pm 0.2 \text{ \AA}$ であることを確かめる。糖 **1** について言えば、可能な配座異性体の数 (これを N_{CONF} と呼ぶことにする) が 12 であるのに対して、合計 3 個の TCSC が確認できる。



α anomer

β anomer

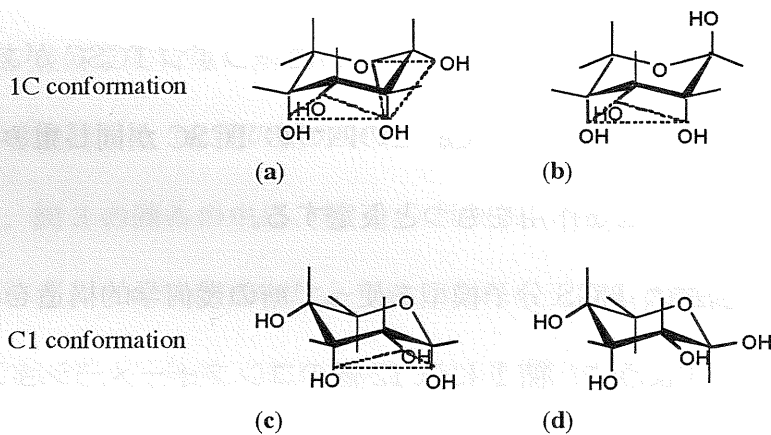


図 3 リボース(4)を例に挙げて、糖が取りうる立体配座の数(N_{CONF})、および、その立体配座の中で、三つ一組の水酸基が近接して形成される最小の三角形（外接円の半径が最小となる）の数(N_{TCSC})を数える方法を示した。上段の囲みは、酸素原子間距離 l_1 、 l_2 、 l_3 を用いて形成される最小の三角形(TCSC)を例示したものである。

上記の手順に倣って N_{CONF} および N_{TCSC} を数えることができるが、糖 8、9、10 は C(1) - C(2)炭素間結合が自由回転する糖であること、糖 15、16 は α -アノマーのみが存在する糖であることに留意する。

以上のようにして、18 種の糖の分子模型を用いて各々の糖の N_{CONF} 、 N_{TCSC} およびこ

これらの比 $R = N_{\text{TCSC}} / N_{\text{CONF}}$ を求め、その結果を表 1 にまとめた。糖の吸着等温線から算出したラングミュア定数 a は、それぞれの糖分子の幾何学的性質から導かれた R 値と線形相関を示した。両者の関係は、次の回帰直線(図 5)で近似されることがわかった。

$$“a” = 28R + 1 \quad (3)$$

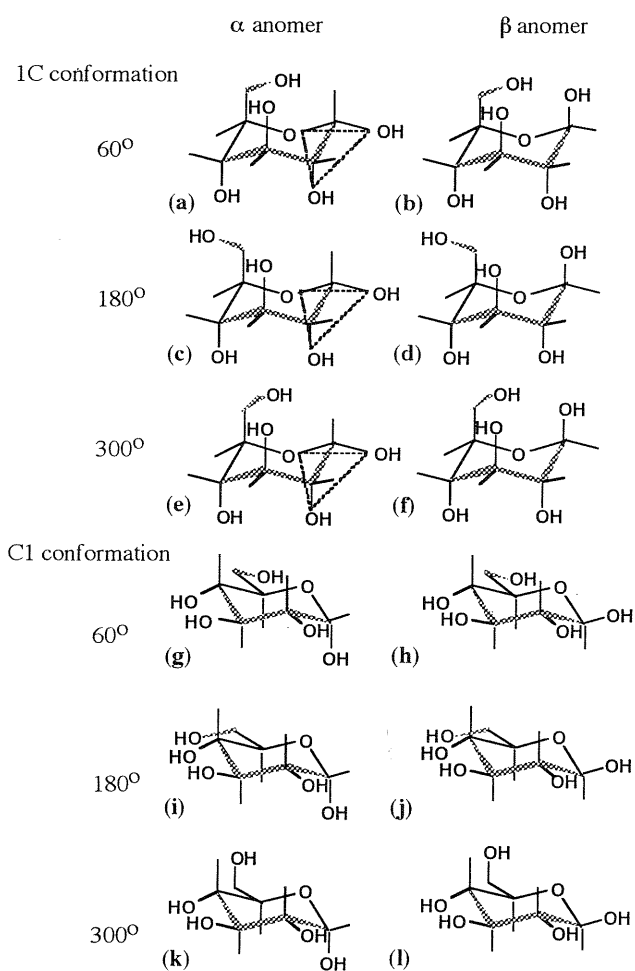


図 4 グルコース(1)について、(i) アノマー、(ii) コンフォーマー、(iii) ロータマーを考えに入れ、この糖の N_{CONF} と N_{TCSC} の数を数える方法を例示した。

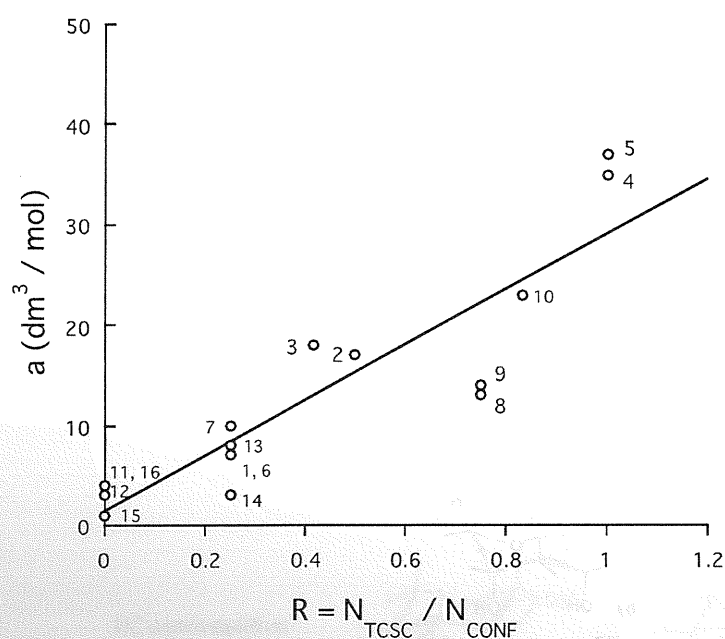


図5 糖分子1～16について、各々の糖のラングミュア一定数 a を R 値 ($= N_{\text{TCSC}}/N_{\text{CONF}}$) に対してプロットした。このプロットを直線近似して、本文中の式(3)を得た。

[HZO と HIO の糖の吸着能の比較]

希土類イオンと糖の錯生成[14]についての研究によると、糖との錯生成に最も適したイオン半径は $0.95 \sim 0.98 \text{ \AA}$ であり、これに近いイオン半径を持つ金属イオンほど、錯生成しやすいことがわかっている。Zr(IV) および Fe(III) のイオン半径は、それぞれ 0.79 \AA および 0.64 \AA であり、前者は後者と比べて糖と錯生成しやすいと考えられる。一方、吸着剤 HZO は HIO と比べてすべての糖について “ a ” の値が大きく (表 1)、前者は後者と比べて糖と吸着しやすい。そう言う意味では、HZO 及び HIO 表面への糖の吸着を、Zr(IV) および Fe(III) イオンとの錯生成反応として理解することが可能であり、錯生成の強さもまた糖分子の幾何学的性質から導いた R 値から推定できるといえる。

引用文献

- [1] M. Ohnishi, Introduction for Polysaccharide Science, Baihukan, Tokyo, 1994, pp. 34-41.
- [2] G. L. Roy, A. L. Laferriere, and J. O. Edwards, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **4**, 106-114 (1957).
- [3] S. J. Angyal and K. P. Davies, *Chem. Commun.*, **1971**, 500-501.
- [4] Y. Inoue, Y. Katsumata, K. Tani and Y. Suzuki, presented in part at the 55th Meeting of the Japan Society for Analytical Chemistry, Toyama, June, 1994, p. 328.
- [5] J. A. Davis and J. O. Leckie, *Environ. Sci. Technol.*, **12**, 1309-1315 (1978).
- [6] T. Aoki and M. Munemori, *Nippon Kagaku Kaishi*, **1983**, 1267-1270.
- [7] T. Hori and M. Sugiyama, *Analyst*, **117**, 893-897 (1992).
- [8] T. Hori, Y. Sugiyama, and M. Sugiyama, *Bunseki Kagaku*, **43**, 965-970 (1994).
- [9] H. Yokoi, T. Tsutsui, Y. Mori, and T. Mitani, *Chem. Lett.*, **1991**, 2231-2232.
- [10] H. Horikoshi, *Kagaku no Ryoiki Supplement*, 1958, **34**, 36.
- [11] L. D. Hayward and S. J. Angyal, *Carbohydr. Res.*, **53**, 13-20 (1977).
- [12] S. J. Angyal, *Chem. Soc. Rev.*, **1980**, 415-428.
- [13] (a) A. Horvik, *Acta Chem. Scand.*, **25**, 2175 (1971); (b) G. F. Richards, *Carbohydr. Res.*, **26**, 448 (1973); (c) E. Hough, S. Neidle, D. Rogers and P. G. H. Troughton, *Acta Crystallogr.*, **B29**, 365 (1973); (d) A. Hordvik, *Acta Chem. Scand.*, **B28**, 261 (1974); (e) P. F. Longchambon, J. Ohannessian, D. Avenel, and A. Neeman, *Acta Crystallogr.*, **B31**, 2623 (1975); (f) W. J. Cook and C. E. Bugg, *Biochim. Biophys. Acta*, **389**, 428 (1975); (g) B. Sheldrick, *Acta Crystallogr.*, **B32**, 1016 (1976); (h) P. F. Longchambon, D. Avenel, and A.

Newman, *Acta Crystallogr.* **B32**, 822 (1976); (i) W. J. Cook and C. E. Bugg, *Acta Crystallogr.*, **B32**, 656 (1976); (j) S. Takagi and G. A. Jeffery, *Acta Crystallogr.*, **B33**, 3033 (1977); (k) S. Takagi and G. A. Jeffery, *Acta Crystallogr.*, **B33**, 3510 (1977); (l) J. A. Kanters, G. Roelofsen, B. P. Alblas and I. Meinders, *Acta Crystallogr.*, **B33**, 665 (1977).

[14] S. J. Angyal and D. C. Craig, *Carbohydr. Res.*, **241**, 1-8 (1993).

第2章 水酸化鉄に対するカルボン酸類の吸着について

(堀 智孝・杉山裕子)

海水・湖水・河川水といった天然水中の微量化学成分を同定し、その濃度を精度良く定めるには、これらを主要成分から分離し、併せて、計測可能な濃度領域にまで濃縮する必要がある。予備濃縮と称されるこの操作は機器分析の高感度化が実現している今日でも、地球化学並びに環境化学的試料の分析には不可欠である。本章では環境中の微量生理活性有機化合物の定量法を確立するために、まずその基礎条件を確定する目的で、水酸化鉄 (Hydrous Iron Oxide、HIO) による有機化合物の吸着挙動を検討した。すなわち、生理活性有機化合物のモデル化合物として一群のカルボン酸並びにその類縁化合物を取り上げて、それらの化学構造と HIO への吸着挙動を系統的に比較した。

Ishibashi とその共同研究者らは、海水試料から微量成分元素を予備濃縮する方法の一つとして、水和金属酸化物、とりわけ水酸化鉄への各種微量成分の吸着現象に注目して大系的な研究に取り組み、これまでにその成果を総数 108 編の海洋の化学的研究と題する論文として公表するとともに、今日の海洋化学の基礎を築いた。これらの報文の中から水酸化鉄ならびに類縁の吸着剤を用いた研究事例を取り出し、表 1 にまとめた。

Fujinaga ら[6]は、HIO への吸着現象が試水の pH に顕著に依存することを指摘し、pH の調節を厳密にすることによって各種化学成分の吸着捕集率の再現性を理想的といえるまでに改善した。このことを端緒にして吸着現象を吸着率の pH 依存性として、言い換えれば吸着率 - pH 曲線 (以下、吸着曲線と略記する) を基にして考察する手法が確立した。実際この手法に沿って桑本[3]は、海水中の V、Mo、W を研究し、これらの溶存量の決定に成功すると同時にその値の地球化学的意味の解明を行った。すなわち V、Mo、W の海水中溶存量はこれらの地殻存在量 (クラーク数) に加えて、水酸化鉄への pH 8 にお

ける吸着率が大きな要因となるという発見である。

吸着曲線を比較するという Fujinaga の提案は、新たに微量成分元素の化学的形態（元素の酸化数の違いや錯形成の状態を示唆するもので、chemical speciation と称される）を解明する方法を生んだ。すなわち、Nakayama[13]は吸着剤として水酸化ビスマスを用いると Cr(III)はこれに吸着捕集されるのに対して Cr(VI)は吸着されないこと、また HIO を用いると UO_2^{2+} は吸着されるが $[\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2]^{2-}$ は吸着されないことなどを明らかにし、実際に外洋海水においてこれらの Cr や U と言った微量元素の化学的形態別の分布を観測している。その後この方法が多くの系に適応されるようになって、微量元素の分布の形態を基礎にして逆に海水の動きや水域の特質を議論することが可能になった。

以上のように HIO 吸着法が海洋化学を中心とする水圏化学研究において多用される中であって Hori ら[14、15]は最近この手法の新しい応用として、これまでの無機元素の捕集に代わって一群の有機リン化合物の捕集に取り組んでいる。HIO を吸着剤とすると、これら有機リン化合物の予備濃縮が可能になると同時に、吸着曲線の形状を詳しく描くと、被吸着種であるリン化合物の構造化学的性質が推定できるという提案である。この研究の結論を要約すると次のようになる。

アデノシン三リン酸をはじめとするリン化合物はどれも高 pH では吸着しないアニオン吸着型の吸着曲線を描き、その吸着曲線の形状は、主に分子内の P-O-の数によって決定され、分子内の P-O-の数が多くなると吸着は強くなる。また、分子内に核酸塩基や糖があっても P-O-を持つ化合物の吸着に際しては P-O-の部位での吸着が優先的である。

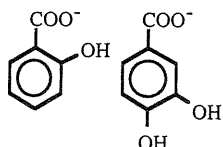
この Hori らの報告は水圏中における有機化合物の HIO への吸着という観点でも興味深く、多くの天然水が示す中性付近の pH でかなりの有機リン化合物が、鉄を含有する沈降粒子により除去されている可能性を示していると言える。

表 1 海水中の無機微量元素の金属水酸化物による吸着捕集

元素名	吸着剤	海中濃度(mg/kg)	文献
Se(IV)	HIO [#]	0.055	1
W(VI)	HIO [#]	0.01	2
V(V)	HIO [#]	2.0(IV+V)	3
V(IV)	HIO [#]		4
Cr(III)	HIO [#]	0.0026	5
Cr(VI)	HIO [#]	0.26	5
Mo(VI)	HIO [#]	11	6
As(III)	HIO [#]	0.0052	7
As(V)	HIO [#]	1.7	7
Sb(III)	Al(OH) ₃	0.24	7
U(VI)	HIO [#]	3.2	8
Ru(III)	HIO [#]	0.0000051(III+IV)	9
Ru(IV)	HIO [#]		9
P(V)	HIO [#] , Mg(OH) ₂	62	10
Be(II)	HIO [#]	0.00020	11
Al(III)	HIO [#]	0.027	12

[#]HIO = Fe(OH)₃

表 2 有機化合物の金属水酸化物への吸着

有機化合物	吸着剤	文献
 グルタミン酸	HIO [#]	16
アミノ酸 (20種)	Fe(III), Cu(II) 混合水酸化物	17
アスパラギン酸 グルタミン酸	Fe(III), Bi(III) 混合水酸化物	18
アスパラギン酸 グルタミン酸 グリシン フェニルアラニン リシン	HIO [#]	19
アミノ酸 (15種)	粘土鉱物 (カオリナイト、モンモリロナイト)	20
ミリスチン酸 パルミチン酸 ステアリン酸	CaCO ₃	21
グルタミン酸 グリシン リシン	AlとSiの混合水酸化物 MgとSiの混合水酸化物 TiとSiの混合水酸化物	22, 23, 24
マレイン酸 フマル酸	モンモリロナイト	25
D-グルタミン酸 L-グルタミン酸 D-アスパラギン酸 L-アスパラギン酸	モンモリロナイト	26
糖	HIO [#]	27

[#]HIO = Fe (OH)₃

水圏中に溶存している有機化合物の大部分は、光合成などの生物活動により生産され、放出されたものであると言われている。従って溶存有機物の多くはタンパク質・アミノ酸・炭水化物・核酸・色素など生物体を構成している物質、およびそれらの分解中間体であると考えてよい。

タンパク質を例にとると、水中に放出されたタンパク質は、まずアミノ酸に加水分解され、このアミノ酸は脱アンモニア作用により有機酸に酸化される。その他の生物起源の化合物にも分解の中間体として有機酸を経由するものが多い。従って溶存有機化合物を同定・定量できる濃度にまで予備濃縮する方法を検討するにあたってカルボキシル基を持つ化合物に焦点を絞り、それらの濃縮同定法を実験室実験によって確立することが賢明であると考えた。なお、有機化合物の、HIO や類縁の無機化合物への吸着現象には表 2 のような研究がある。

実 験

[試 薬]

水和酸化鉄(HIO)に対する吸着曲線を描いた有機化合物は、次の 34 種である。

benzoic acid(1)、phthalic acid(2)、trimellitic acid(3)、trimesic acid(4)、pyromellitic acid(5)、isophthalic acid(6)、terephthalic acid(7)、homophthalic acid(8)、salicylic acid(9)、*m*-hydroxybenzoic acid(10)、*p*-hydroxybenzoic acid(11)、*o*-aminobenzoic acid(12)、*m*-aminobenzoic acid(13)、*p*-aminobenzoic acid(14)、*o*-chlorobenzoic(15)、*m*-chlorobenzoic acid(16)、*p*-chlorobenzoic acid(17)、maleic acid(18)、fumaric acid(19)、succinic acid(20)、malic acid(21)、citric acid(22)、 α -hydroxypropionic acid(23)、 β -hydroxypropionic acid(24)、aspartic acid(25)、 α -alanine(26)、 β -alanine(27)、monochloroacetic acid(28)、dichloroacetic acid(29)、trichloroacetic acid(30)、formic acid(31)、acetic acid(32)、

propionic acid(**33**)、 octanoic acid(**34**)。

この中で、**1**～**17** については市販特級試薬の計算量を希 NaOH 溶液に、また、それ以外のものは蒸留水に溶解し、何れも 2 mmol/dm^3 濃度とした。

HIO 懸濁液は次の方法で調製した。計算量の市販特級試薬 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を 1 mol/dm^3 HCl に溶解して 1 mg Fe/cm^3 とした後、この溶液の 20 cm^3 に対して同容の 2 mol/dm^3 NH_3 水溶液を混和した。生成した HIO は遠心沈降法で回収し、続いて、蒸留水 20 cm^3 で5回洗浄した。この HIO を蒸留水 15 cm^3 に分散させた後、全量を 20 cm^3 にした。HIO 懸濁液はアモルファス状態を保つように使用の都度新しく調製し、特記しない限り吸着実験にはこの懸濁液の 4 cm^3 (Fe に換算して 4 mg に相当する量の HIO)を用いた。

[吸着曲線の測定]

共栓付遠沈管 (50 cm^3 容) の各々に有機化合物溶液 (いずれも 2 mmol/dm^3 濃度) 2 cm^3 を取り、蒸留水で 34 cm^3 に希釈した後、HIO 懸濁液 4 cm^3 を混和した。試料の容積変化を無視しうる程度の少量の HCl あるいは NaOH 溶液を加えて試料の pH を所定の値とし、これを室温で 5 h (代表的なカルボン酸 **1**、 **2**、 **9** を用いた予備実験から 4 h 振り混ぜると吸着平衡に達し、それ以降は吸着率に変化がないことを確かめた) 振り混ぜた。吸着平衡後の試料は遠沈し、さらに孔径 $0.4 \text{ }\mu\text{m}$ のヌクレポアフィルタ (フィルタからの有機炭素の混入を防ぐために、あらかじめ 0.5 mol/dm^3 HCl - 0.5 mol/dm^3 HNO_3 混酸中で煮沸洗浄した後超純水で十分に洗浄した) で濾過をして HIO の除去を完全にし、その上澄み液について、pH を測定するとともに残存する有機化合物の濃度を測定した。有機化合物の定量と吸着率の算出は次の方法に従った。すなわち、(i) 芳香環を有する化合物 (**1** ~ **17**) は、pH 10 の下で 240 nm における吸光度を測定し、あらかじめ用意した検量線と比較して濃度を定めた。(ii) 炭素鎖に $-\text{NH}_2$ 基を有する化合物 (**25** ~ **27**) はニンヒドリン法[35]で、(iii) その他、脂肪族カルボン酸は全有機体炭素測定装置 (島津製作所、

Shimadzu TOC-5000) により有機炭素として定量した。最初に添加した有機化合物量と HIO との吸着平衡後に残存する有機化合物量から吸着率を算出し、この値を吸着平衡時の pH に対してプロットし、吸着曲線を描いた。

結果と考察

[カルボン酸分子が有する官能基の種類と数および置換位置による吸着挙動の体系化]

被吸着物質として用いたカルボン酸を、その pK_{a1} とともに、図 1 に示す。芳香族カルボン酸は安息香酸を、脂肪族カルボン酸は酢酸を基準にして置換基の種類と数、置換位置が吸着挙動に与える効果を検討した。置換基としては水酸基、アミノ基、クロロ基を選択した。また、直鎖のカルボン酸である酢酸とオクタン酸の比較から分子の疎水性の影響についても検討した。

[カルボキシル基の数が吸着挙動に及ぼす影響]

化合物 1 ~ 5 は何れも官能基として HOOC -基のみを有する芳香族カルボン酸であって、分子内の HOOC -基の数は順に 1、2、3、3、4 個である。各々の化合物の吸着曲線を図 2 に重ねて示した。分子内に HOOC -基を 1 個有する 1 の吸着率は pH 7 付近では無視しうる程度であるが、pH の低下とともに増大し始め、pH 5~4 の間で急激に上昇して、HIO の溶解が始まる直前の pH 3.5 では 60%に達する。また、この吸着曲線から $\text{pH}_{1/2}$ 値（吸着率が 50%となる pH 値）として 4.0 を読みとることが出来る。また、HIO 量を図 2 で使用した 4 mg から 40 mg まで変化させた場合の pH 4 における 1 の吸着率を図 3 に示す。このように、HIO の使用量を大きくすると、それに伴って吸着率は増大するので、1 の予備濃縮は HIO を増量することによって実質的に可能になる。先にも述べたが、以下の考察ではこの化合物の吸着曲線を基準に選び、これを参照しながら各化合物の吸着性

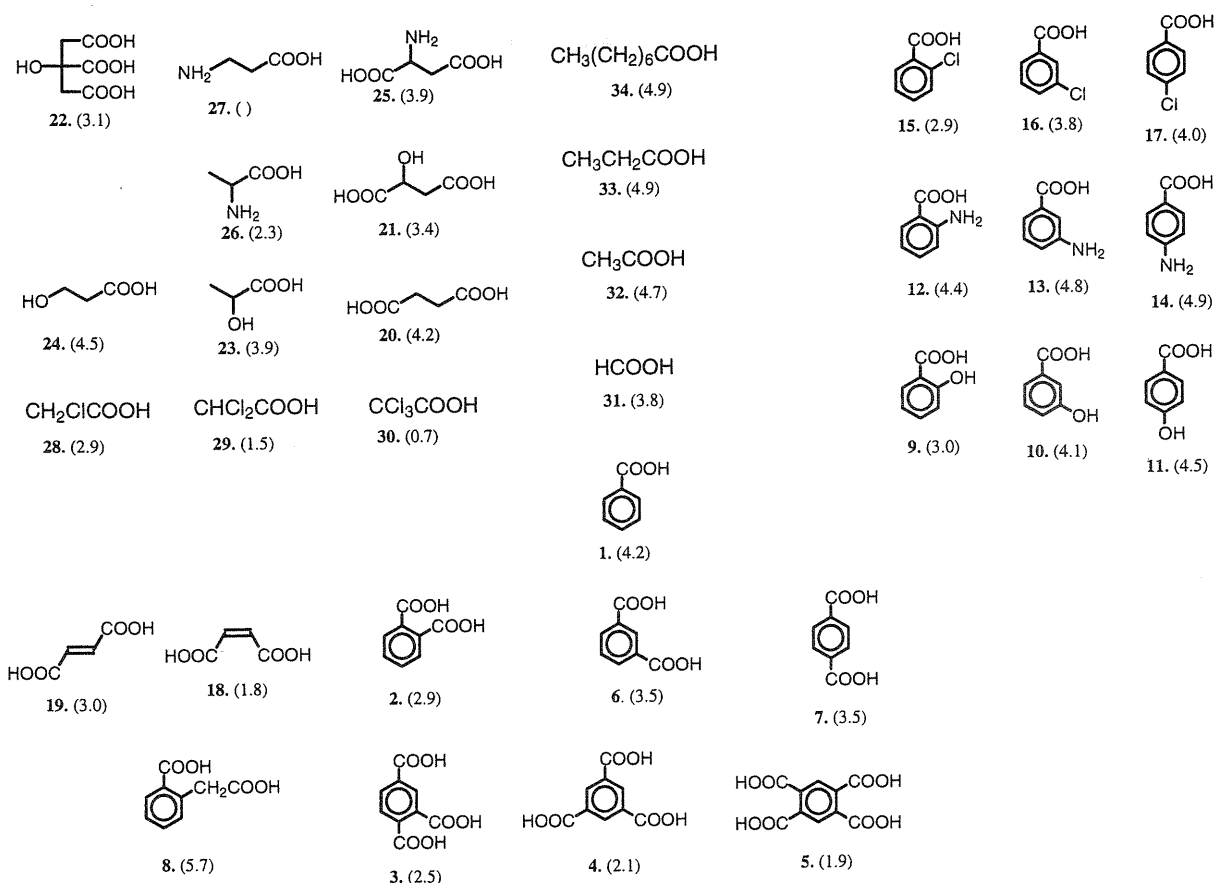


図 1 生理活性有機化合物のモデルとして用いたカルボン酸とその誘導体。()内の数値は、酸の pK_{a1} である。

の強弱を論ずることとする。すなわち基準の吸着曲線に比べて、それより高い pH 領域に吸着曲線が描かれる場合、従って $pH_{1/2} > 4.0$ となる場合、その化合物は HIO によって効果的に予備濃縮されると判定した。

分子内に 2 個の $HOOC$ -基を有する **2** は、より強く HIO に吸着される。図に示すように、**2** の吸着曲線は **1** に比べて pH の高い領域に向かって約 3pH ユニット移動し、 $pH_{1/2} = 6.8$ である。分子内に複数の $HOOC$ -基を有する化合物に対して HIO は効果的な吸着捕集剤となる。

図 4 は、芳香族ジカルボン酸 **2**、**6**、**7** を用いて、HOOC-基の置換位置の効果を確かめた結果である。この三者の中に目立った差異はないが、詳しく比較すると、分子内の 2 個の HOOC-基がメタあるいはパラ位にある **6** と **7** では吸着曲線がほぼ一致し $\text{pH}_{1/2} = 6.2$ を与えるのに対して、オルト位の **2** はやや強い吸着性 ($\text{pH}_{1/2} = 6.8$) を示している。また、**2** の化学構造において HOOC-基の一方を HOOCCH_2 -基に置き換えると **8** となるが、この両者の吸着曲線は一致する。分子内で HOOC-基が互いに近接している場合 (**2** と **8**) には、離れている場合 (**6** と **7**) に比べて、吸着性が増大する効果が現れることになる。

芳香族カルボン酸に関する上述の議論はほぼそのまま脂肪族カルボン酸にも適用できる。図 5 はこのことを示すものであって、三種類のジカルボン酸 **18** ~ **20** の吸着曲線を重ねている。曲線が示すようにこれら三者の $\text{pH}_{1/2}$ はそれぞれ 6.7、6.1、6.7 であって、いずれも HIO に強く吸着されること、加えて、2 個の HOOC-基がシス型 (**18**) のものがトランス型 (**19**) より強く吸着されること、つまり 2 個の HOOC-基が空間的により近接し得るような構造が吸着を有利にすることがわかる。化合物 **20** の吸着曲線が **19** (トランス型) よりも **18** (シス型) の曲線に重なることも、同じ要因であると考えられる。

[吸着曲線に及ぼすカルボン酸分子中の水酸基の効果]

分子内に HOOC-基と併せて HO-基が導入されると吸着は著しく強くなる。また、HO-基の置換位置も重要である。図 6 は、HOOC-基を 1 個有する芳香族化合物のオルト、メタ、パラ位のそれぞれに HO-基を導入した場合の吸着曲線を比較したものである。HO-基を含まない場合 (**1**) の吸着曲線が $\text{pH}_{1/2} = 4.0$ であるのに対して、メタ位 (**10**) あるいはパラ位 (**11**) に HO-基が導入されると、吸着が促進されて $\text{pH}_{1/2} = 5.2$ となる。この効果はオルト位 (**9**) の HO-基でさらに促進されて、 $\text{pH}_{1/2} = 7.2$ となる。

同様の効果は脂肪族カルボン酸でも認められる。図 7 はその結果である。HO-基が導

入されていない **33** で $\text{pH}_{1/2} = 4.7$ となるのに対して、導入された **23** と **24** ではそれぞれ $\text{pH}_{1/2} = 6.0$ および 5.6 となり、 HOOC -基と HO -基を併せ持つ化合物が HIO に有利に

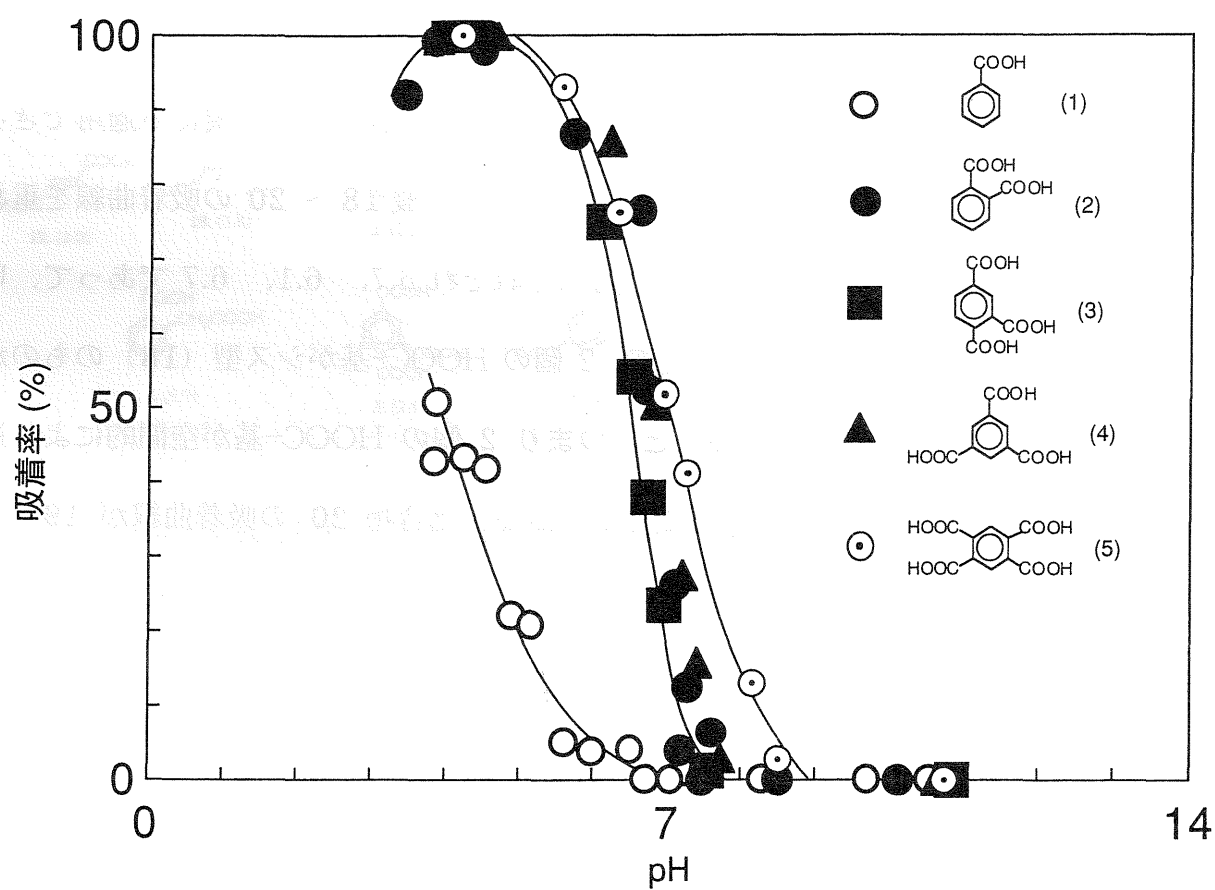


図 2 カルボン酸 **1** ~ **5** の吸着曲線。各々のカルボン酸溶液 (0.1 mol/dm^3) 40 cm^3 に、HIO 懸濁液 (Fe として 4 mg) を加え、 pH $4 \sim 11$ に調整した後、約 5 h 振り混ぜた。平衡時の pH に対して吸着率をプロットした。

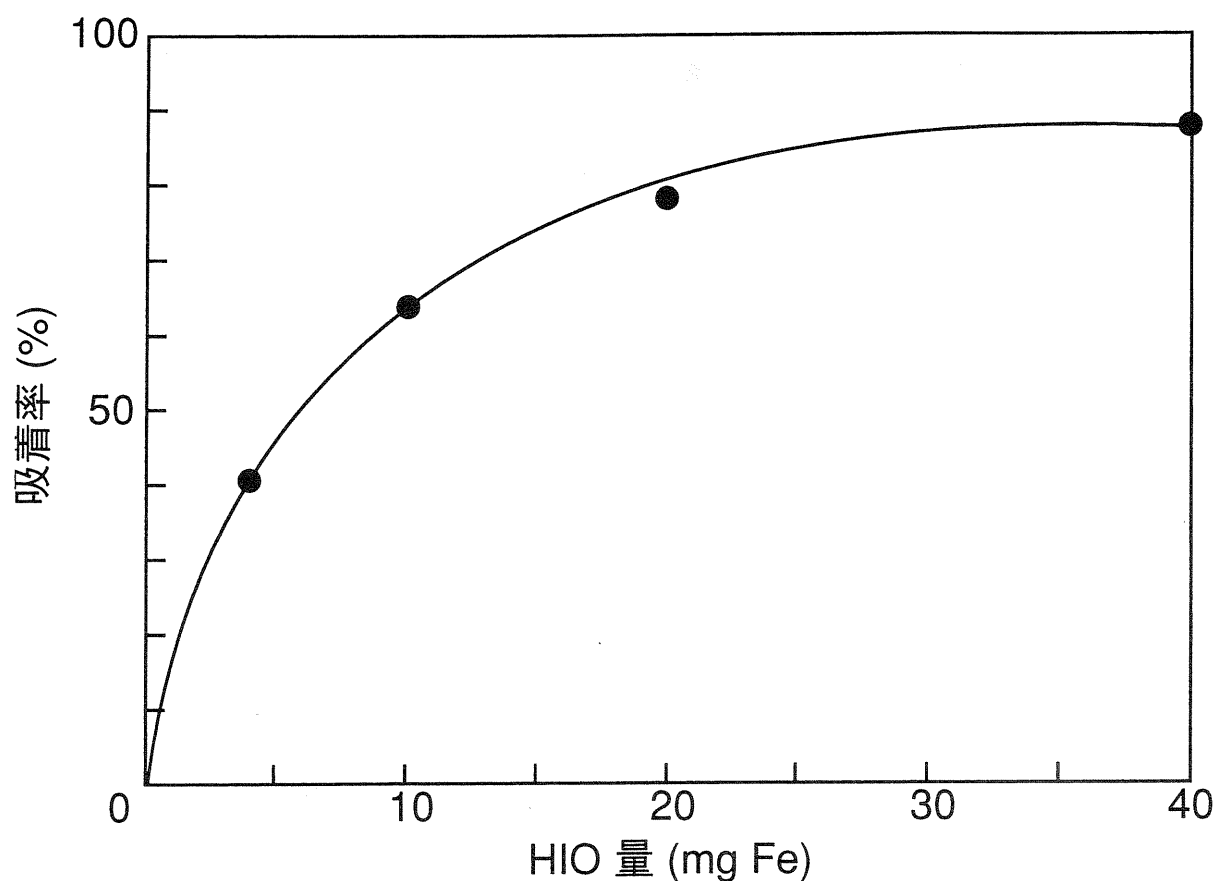


図 3 カルボン酸 **1** の吸着に必要な HIO の量。0.1 mol/dm³ 濃度の **1** 溶液 40 cm³ に、HIO 懸濁液 (Fe として 4 ~ 40 mg) を加え、pH 4 に調整した後、5 h 間振り混ぜた。HIO の量に対して、吸着率をプロットした。

吸着することを的確に示している。ジカルボン酸 **20** と **21** の比較も同様であって、前者の $\text{pH}_{1/2} = 6.7$ は HO-基によって後者の $\text{pH}_{1/2} = 7.4$ へ移る。一般的に言って、HOOC-基に近接して HO-基が導入されると、 $\text{pH}_{1/2}$ はほぼ 1pH ユニット増大する。また、3 個の HOOC-基と 1 個の HO-基を併せ持つ(**22**)は、(**21**)に比べて $\text{pH}_{1/2}$ がさらに 1pH ユニット増大する。

官能基として HO-基のみを有する有機化合物 (糖類) を HIO に吸着させた Yokoi らの研究結果[34]と比較すると、分子中に HOOC-基と HO-基を併せ持つ化合物 (ヒドロキシカルボン酸) の吸着が目立って強いことがわかる。この現象は HIO を用いて有機化合物を吸着捕集する際に有効に利用されて良いものである。

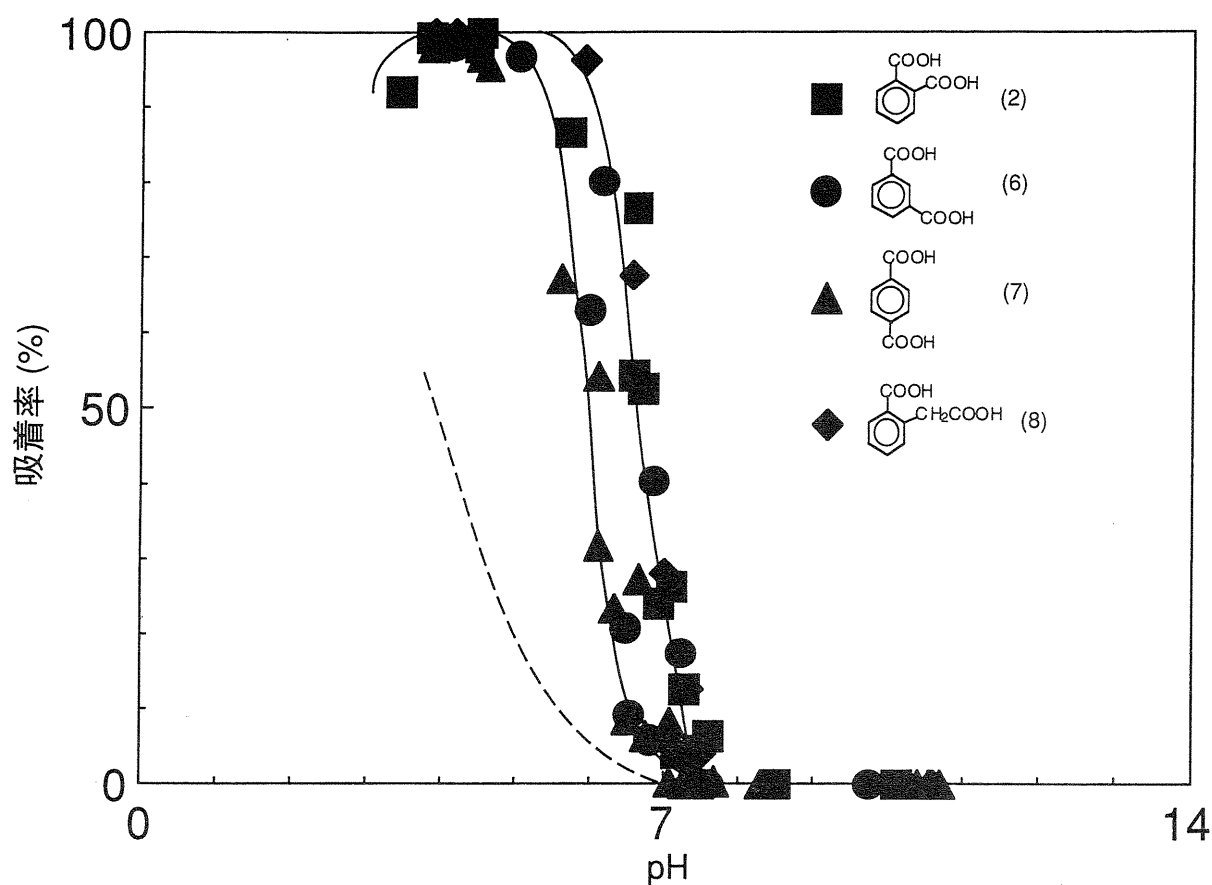


図 4 カルボキシル基の置換位置が異なる芳香族ジカルボン酸 2、6、7、8 の吸着曲線。濃度が 0.1 mol/dm^3 の各カルボン酸溶液 40 cm^3 に、HIO 懸濁液 (Fe として 4 mg) を加え、pH 4 ~ 11 に調整した後、5 h 間振り混ぜた。平衡時の pH に対して、吸着率をプロットした。

[吸着曲線に及ぼすカルボン酸分子中のアミノ基の効果]

H_2N -基が芳香族カルボン酸に導入されても、その効果は目立たない。すなわち、図 8 は 1 に対して H_2N -基がオルト(12)、メタ(13)、パラ(14) 位に導入された場合の吸着曲線を比べたものであるが、図に示すように三者の吸着曲線は相互に類似し、吸着率は pH 4 付近で 50% に近づいた後、これを最高値として pH の低下とともに下降する。カルボン酸 12 ~ 14 の吸着曲線を pH 5 から 4 に向かって外挿するとそれぞれ $\text{pH}_{1/2} = 5.0$ 、4.2、

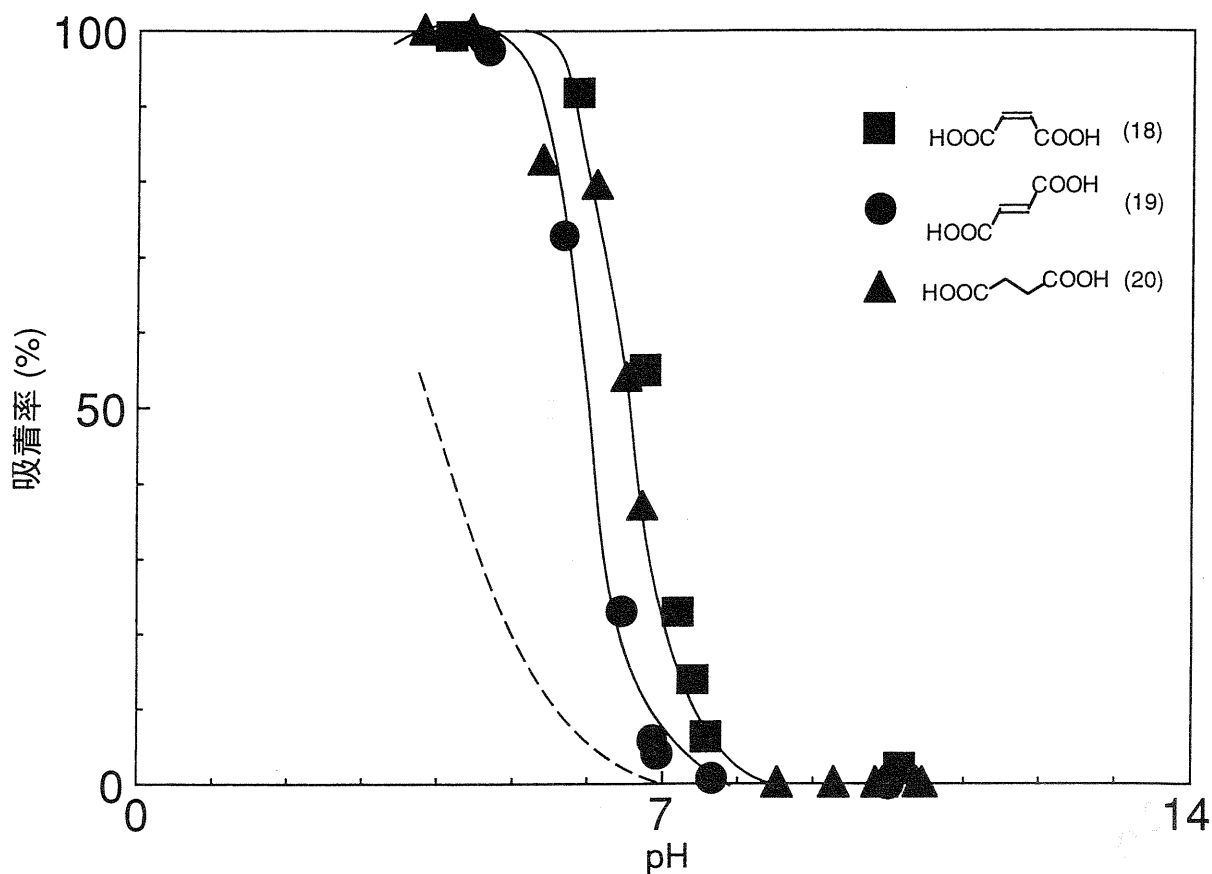


図 5 脂肪族ジカルボン酸 18 ~ 20 の吸着曲線。条件は図 4 と同じである。

および 4.6 が求まる。これまでに論じてきたその他の官能基の場合と同様に、 H_2N -基がオルト位に導入されるとその効果は最大となるが、それでもその効果は吸着曲線を 1pH ユニット移動させる程度の小さなものである。

脂肪族カルボン酸に H_2N -基を導入するとこの効果はむしろ吸着を妨げるように現れる。 H_2N -基を持たない **33** (プロピオン酸の吸着曲線は図 2-10 参照) は $\text{pH}_{1/2} = 4.7$ を与えるのに対して、この化学構造に H_2N -基が α 位 (**26** : α -アラニン) あるいは β 位 (**27** : β -アラニン) に導入されると、吸着現象はほとんど認められなくなる。Davis と Leckie はこのことをアミノ酸の HIO への吸着現象の研究の中で認めており、アミノ酸で形成される双性イオンは HIO 吸着にあまり活性ではないと記している[23]。宗森らは同様のことを確かめた上で、この種のアミノ酸の吸着捕集に対して、HIO を単独で用いるより HIO

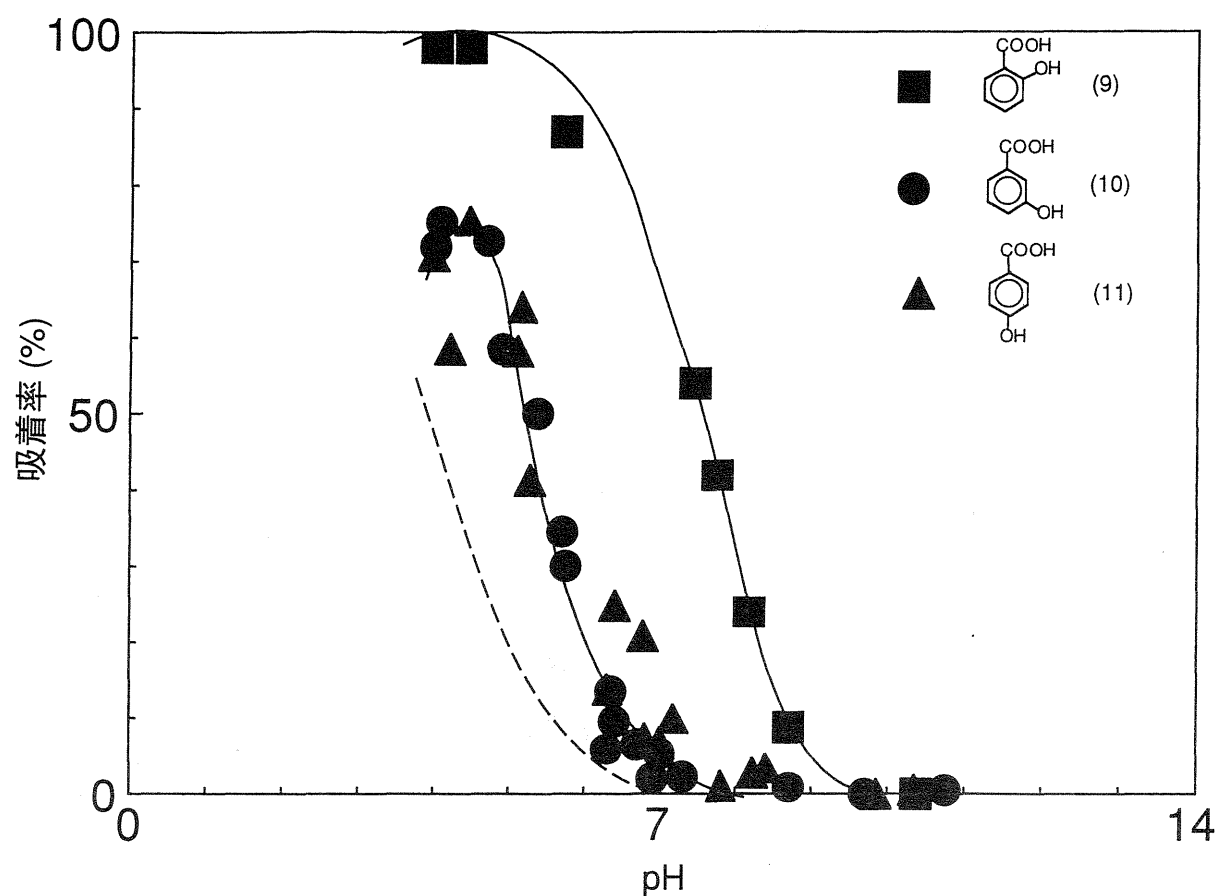


図 6 ヒドロキシル基の置換位置が異なる芳香族ヒドロキシジカルボン酸 9 ~ 11 の吸着曲線。条件は図 4 と同じである。

に $\text{Cu}(\text{OH})_2$ や $\text{Bi}(\text{OH})_3$ の混合した水酸化物が優れた吸着剤となることを発見している[24, 25]。

一方、脂肪族ジカルボン酸 **20** は前述のように $\text{pH}_{1/2} = 6.7$ であるが、これに H_2N -基を導入した **25** では $\text{pH}_{1/2} = 6.2$ となる。 H_2N -基によって化合物の吸着は抑制されるが、それでも分子内に 2 個の HOOC -基を有する化合物（酸性アミノ酸）は、 HIO による吸着捕集が可能であることがわかる。

[吸着曲線におよぼすカルボン酸分子中のクロロ基の効果]

図 9 は芳香環に Cl -基が導入された場合の効果である。オルト位に Cl -基が入ると(**15**)、 HIO への吸着は **1** より弱くなり、この化合物の吸着捕集は実際上不可能となる。メタ(**16**)

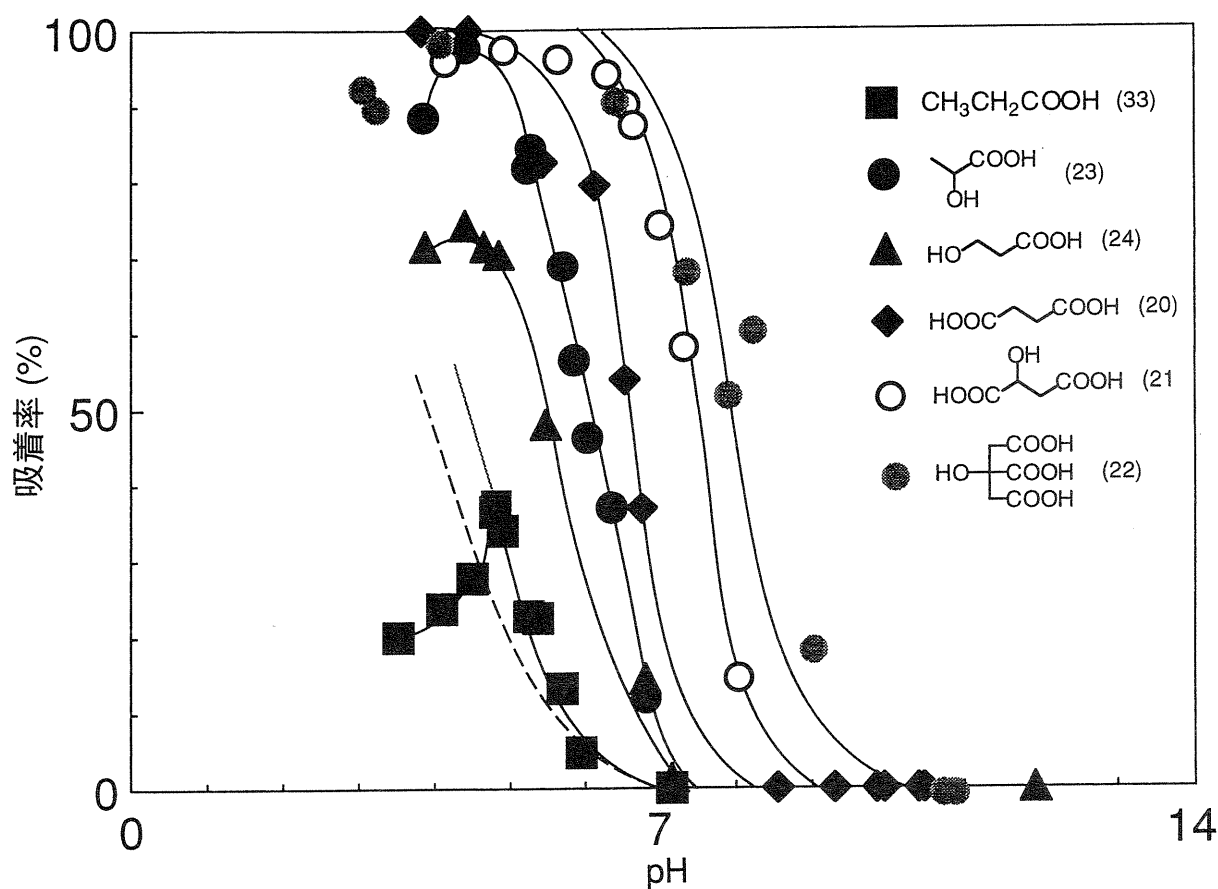


図 7 脂肪族ヒドロキシならびにジカルボン酸 20 ~ 24、33 の吸着曲線。条件は図 4 と同じである。

とパラ (17) の Cl-基はほとんど効果が無く、これらの吸着曲線は 1 の吸着曲線と重なる。

脂肪族カルボン酸 32 のメチル基に Cl-基を順に 1、2、3 個導入すると、図 9 に描いたように、28 ($\text{pH}_{1/2} = 4.0$)、29 (同 3.5)、30 (同 3.5)となる。何れの場合にも Cl-基の存在は HIO への吸着を抑制するように作用し、しかもその効果は Cl-基の数とともに強くなる。Cl-基を有する有機化合物の捕集が容易でないことが予見される。

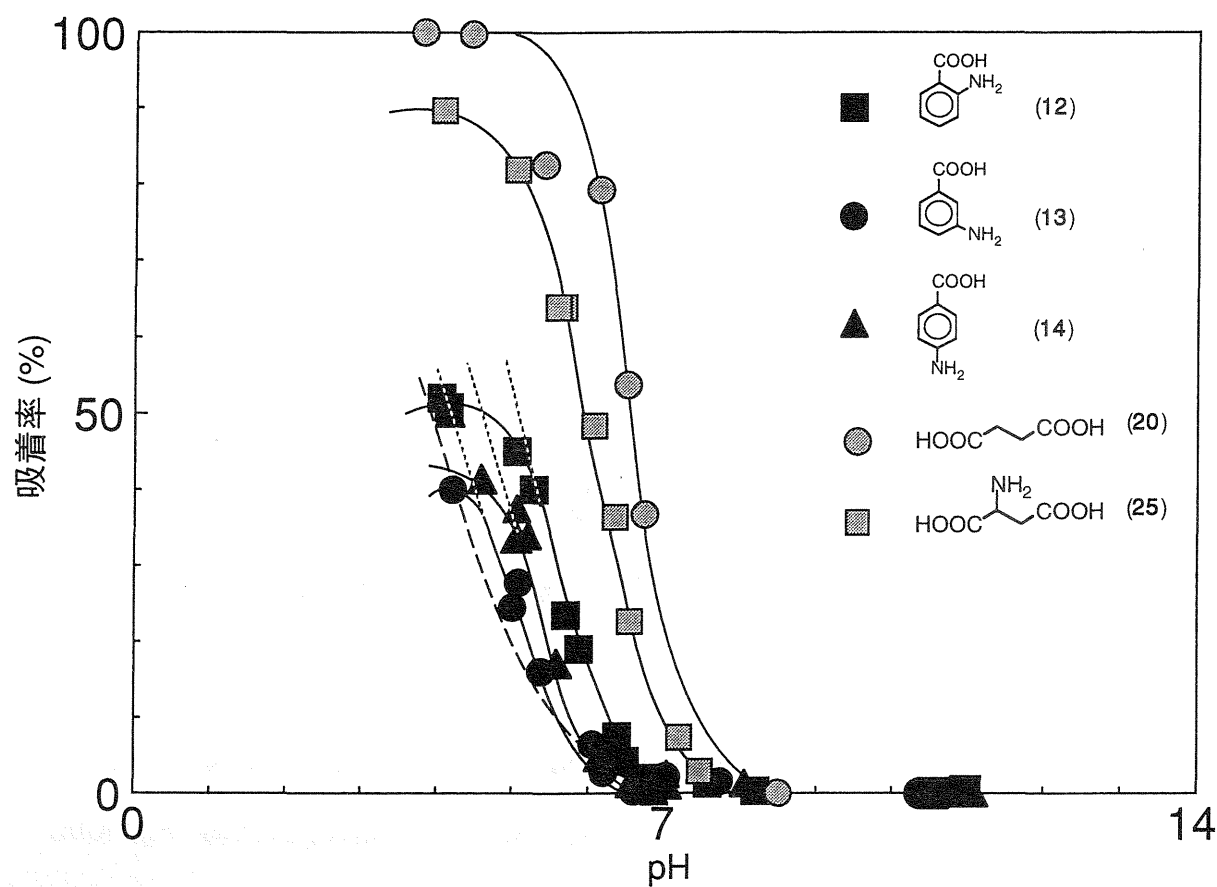


図 8 置換基にアミノ基を有するカルボン酸 12 ~ 14、20、25 の吸着曲線。条件は図 4 と同じである。

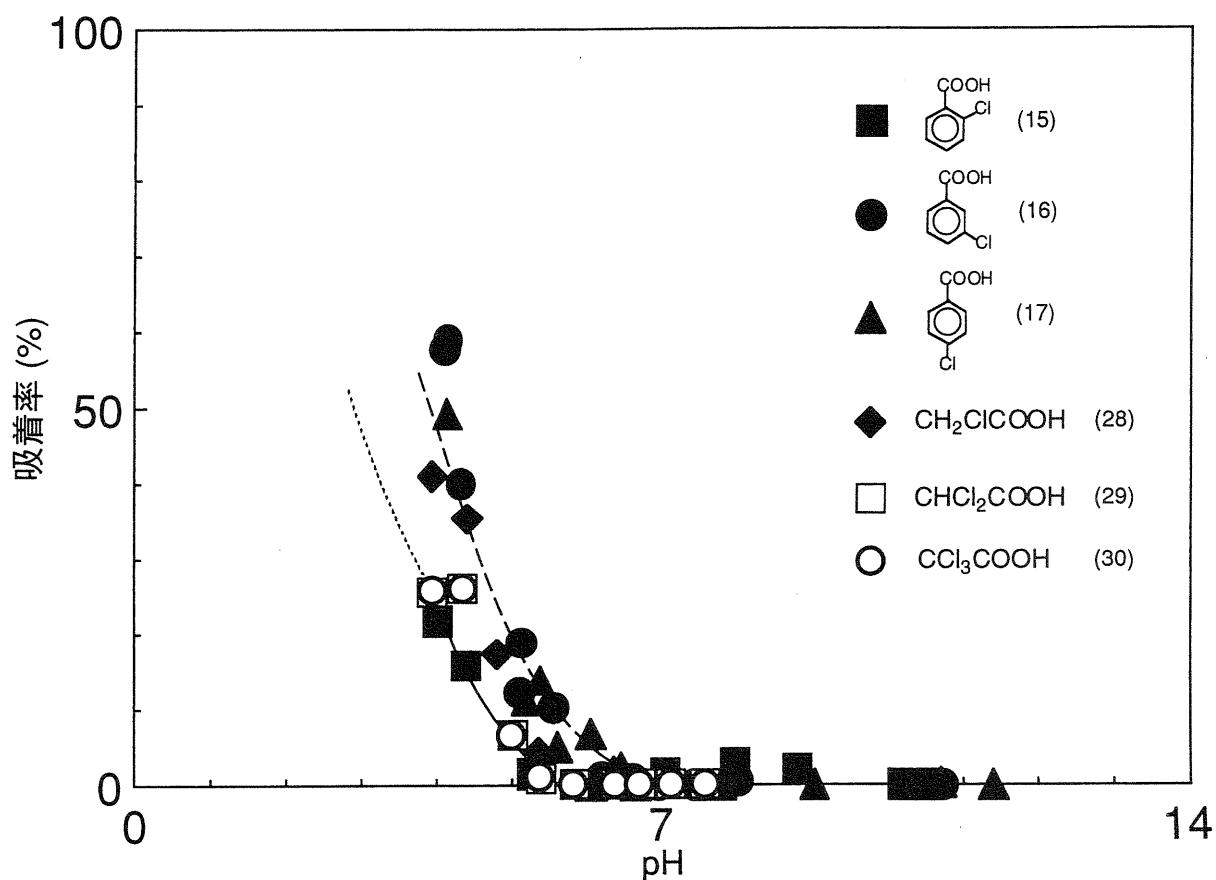


図 9 置換基にクロロ基を有するカルボン酸 15 ~ 17、28 ~ 30 の吸着曲線。条件は図 4 と同じである。

脂肪族カルボン酸 **32** のメチル基に Cl-基を順に 1、2、3 個導入すると、図 9 に描いたように、**28** ($\text{pH}_{1/2} = 4.0$)、**29** (同 3.5)、**30** (同 3.5)となる。何れの場合にも Cl-基の存在は HIO への吸着を抑制するように作用し、しかもその効果は Cl-基の数とともに強くなる。Cl-基を有する有機化合物の捕集が容易でないことが予見される。

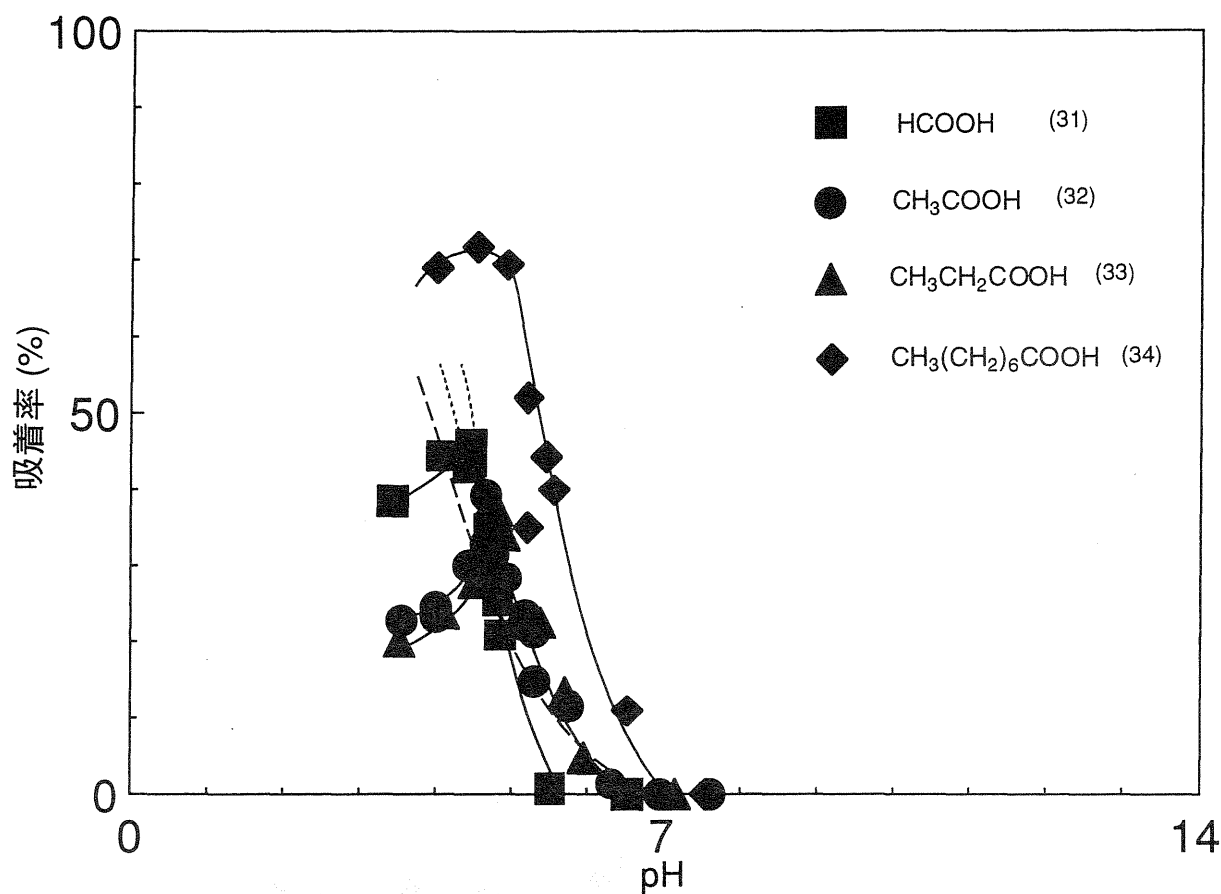


図 10 鎖の長さの異なる脂肪族カルボン酸 **31** ~ **34** の吸着曲線。条件は図 4 と同じである。

[脂肪族カルボン酸における炭素鎖の効果]

図 10 は、4 種のモノカルボン酸 **31** ~ **34** を選んで炭素鎖の長さによる吸着曲線の変化を調べた結果である。これによると、アルキル鎖の炭素数が 0 と 1 個の場合はほとんど変わらないが、3 から 7 個になると吸着が有利になるような効果が現れる。これらの 4 種の化合物の吸着は共通して pH 7 近傍から始まり、pH 5 ~ 4 の間で最大の吸着率を示した後、より酸性側で下降する。各々の吸着曲線を pH の低い方に向かって外挿して $pH_{1/2}$ 値を求めると、炭素数に応じて 4.4 (**31** と **32**)、4.7 (**33**)、5.3 (**34**) となる。これらはいづれ

も、基準に選んだ 1 の吸着 ($\text{pH}_{1/2} = 4.0$) を上回っていて、HIO による予備濃縮が可能であると考えてよい。

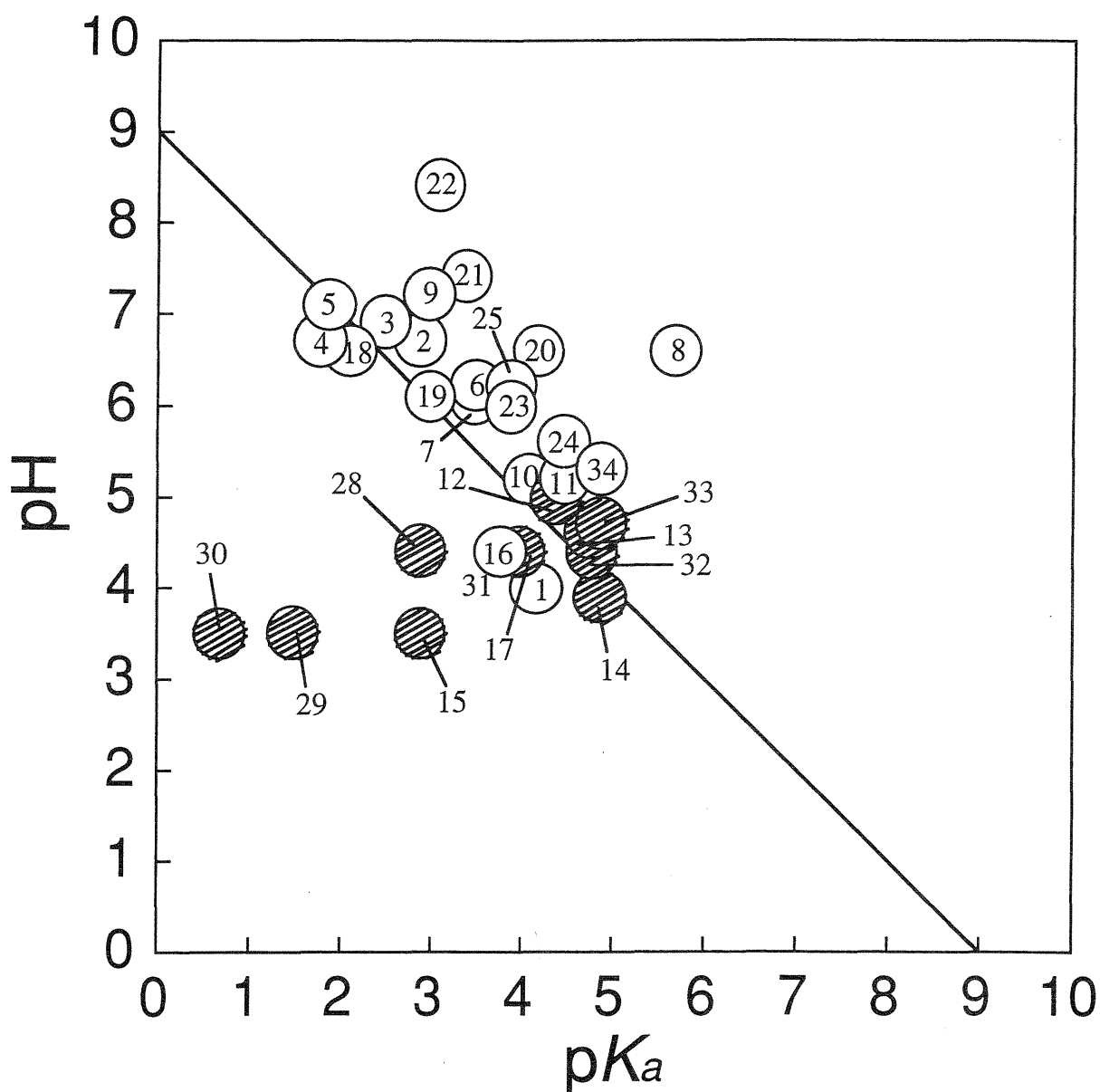


図 11 カルボン酸の pK_a 値と半吸着 pH 値($\text{pH}_{1/2}$)との相関。逐次解離するカルボン酸では第一解離定数(pK_{a1})に対して $\text{pH}_{1/2}$ 値をプロットした。また、吸着曲線を外挿して $\text{pH}_{1/2}$ を決定したものについては、影を付けた。

[カルボン酸の pK_a と半吸着 $pH(pH_{1/2})$ の相関]

これまでの議論で取り上げた 34 種の有機化合物の中で 32 種のものが HIO に吸着性を示し、各々の吸着曲線から $pH_{1/2}$ 値を読みとった。これらの値は、その化合物が HIO で予備濃縮されるかどうかを判定するための有用な数値である。

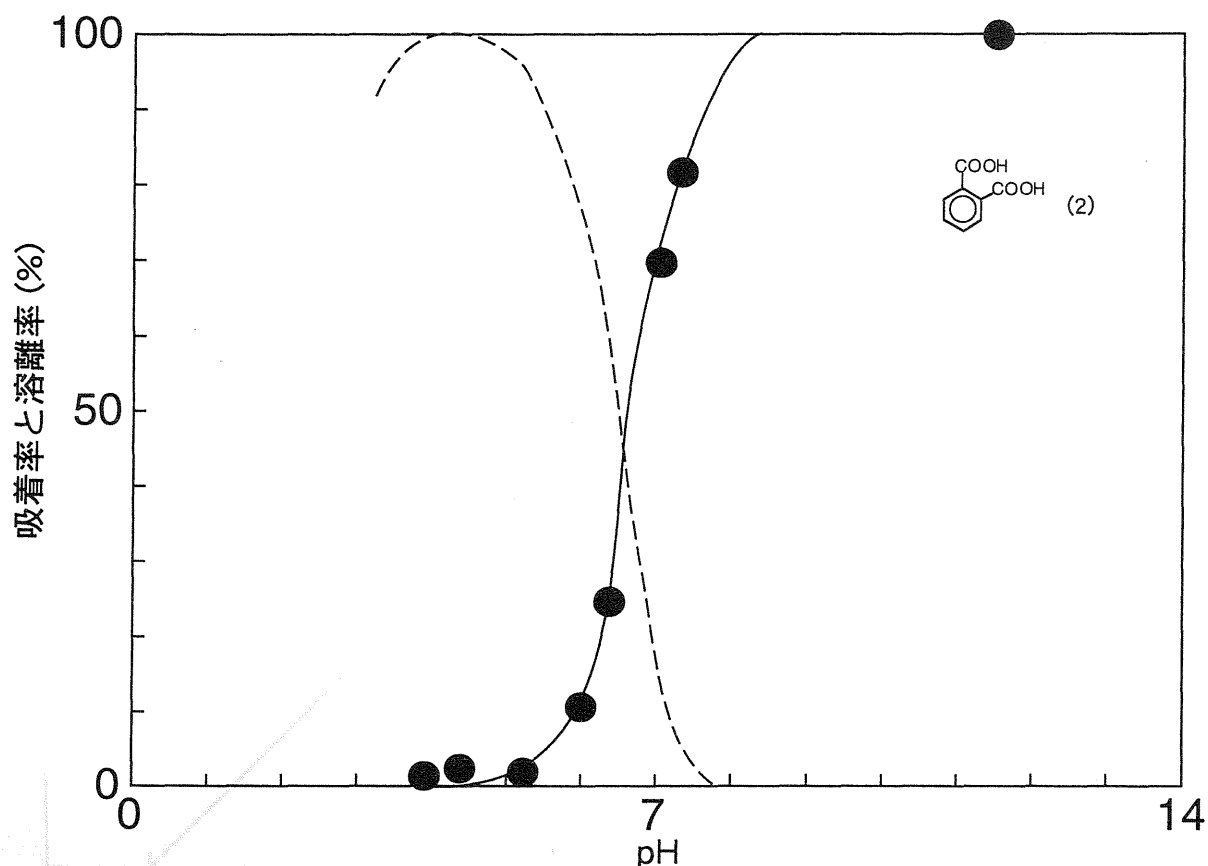


図 12 カルボン酸 2 の吸着平衡の可逆性の検討。2 の溶離曲線を実線で、また、吸着曲線(図 4 に掲げた 2 の吸着曲線)を波線で示した。濃度 0.1 mmol/dm^3 の 2 の溶液 40 cm^3 に、HIO 懸濁液 (Fe として 4 mg) を加え、 $pH 4$ で吸着させた。その後、遠沈法で回収した HIO に純水 40 cm^3 を加え、 $pH 4 \sim 12$ に調整して再度振り混ぜた。母液中に溶離した 2 を定量し、吸着量に対する溶離した割合を求め、溶離時の pH に対してプロットした。

図 11 は、32 件の $pH_{1/2}$ 値をその化合物の HOOC -基の酸解離定数 pK_{a1} に対してプロットしたものである。先述したように、 HOOC -基に近接して Cl -基が存在する場合 (15、28 ~ 30) には目立って吸着の抑制が起こり、また逆に、 HO -基が近接する場合 (9、21 ~ 24)

には吸着の促進が起こるが、その他の場合には図に示すように 2 件の例外 (8、20) はあるが、 $\text{pH}_{1/2}$ と pK_{a1} の間に $\text{pH}_{1/2} = -\text{pK}_{a1} + 9$ の関係が近似的に成り立っている。この直線関係をもとにすると、着目する有機化合物の pK_a 値からその化合物の $\text{pH}_{1/2}$ 値を見積もることが可能になる。HIO による予備濃縮法の成否を予見する上で、効果的な規則性が見いだされたと考えられる。

[吸着と溶離の可逆性]

HIO に吸着濃縮したカルボン酸を溶離し、回収するための条件を 2 を用いて検討した。pH 4 付近で吸着平衡に達した試料を遠沈し、上澄み液を捨てた後、HIO 沈殿に蒸留水 40 cm^3 を注加し、NaOH により試料の pH を所定の値として、再び HIO を分散させた。この懸濁液を 5 時間振騰した後再度遠沈と濾過の操作を行い、HIO から蒸留水中に溶出してきたカルボン酸濃度を求めた。予め求めておいた吸着量と溶離量から回収率を求め、この値を溶離平衡時の pH に対してプロットし、溶離曲線を描いた。このようにして描かれた 2 の溶離曲線をその吸着曲線 (点線) と共に図 12 に示す。溶離率は pH 4~5 では 0% を示し、pH の上昇と共に増大し始め、pH 5~7 で急激に増大して pH 8 付近でほぼ 100% を示した。吸着曲線と比較すると、カルボン酸の HIO への吸着現象は pH の変化に対して可逆なものであることが判る。

[吸着に対する共存塩の影響]

カルボン酸の吸着に対する Cl^- と SO_4^{2-} の影響 :

HIO による吸着濃縮法を天然水に適用するにあたって共存塩の影響を調べた。今回は、海水中に溶存する主要なアニオンである Cl^- および SO_4^{2-} の影響を、被吸着物質としてフタル酸を選び、海水当量を基準として検討した。pH 4 における吸着率を、共存塩の海水当量に対しプロットすると、図 13 のようになった。他のイオンを共存させない条件では、

pH 4 においてフタル酸は 100%吸着されるのに対して、海水等量の Cl^- (36 mmol/dm^3) が共存すると 90%、 SO_4^{2-} (0.028 mmol/dm^3) が共存すると 37%しか吸着されず、明らかにフタル酸の吸着が阻害されていることが判る。しかしながら、共存塩がフタル酸濃度 (0.1 mmol/dm^3) に対して約 300 倍と非常に高濃度であるにも拘わらず、フタル酸の吸着が完全には阻害されなかったことから、フタル酸の吸着が単純な静電的吸着でないことが示唆される。

鉄量を増加することによる塩共存下でのカルボン酸の吸着捕集：

カルボン酸の HIO への吸着は、海水当量の Cl^- や SO_4^{2-} の共存により妨害されることが明らかとなった。これは、HIO に対して共存塩も吸着性を持ち、カルボン酸の吸着部位が共存塩によって占められるためであると考えられる。海水中からのカルボン酸の回収を念頭に置いて、HIO 量を増加することによる吸着捕集の可能性を検討した。

Cl^- あるいは SO_4^{2-} を海水当量共存させたフタル酸溶液に、HIO 沈殿を 4 ~ 40 mg 加え、pH 4 付近での吸着率を調べた。結果を図 14 に示す。

フタル酸の吸着率は、HIO 量を増加する事によって上昇し、 Cl^- 共存では 15 mg 以上、 SO_4^{2-} 共存では 40 mg 以上の HIO によって定量的に吸着捕集されることが判る。本実験においては 0.1 mmol/dm^3 のフタル酸溶液を用いたが、実際の海水中に溶存するカルボン酸類は nmol/dm^3 単位以下と、非常に低濃度であると考えられるので、HIO により十分吸着捕集できることになる。

塩共存下で吸着されたカルボン酸の溶離回収：

塩共存下で HIO に吸着捕集されたフタル酸の溶離を検討した。pH 4 付近で塩共存溶液から吸着させたフタル酸を超純水に再び分散させ、pH を 4 ~ 10 に調整したときに上澄みに溶離したフタル酸濃度を測定し、吸着量に対する溶離量から溶離率 (%) を求めた。

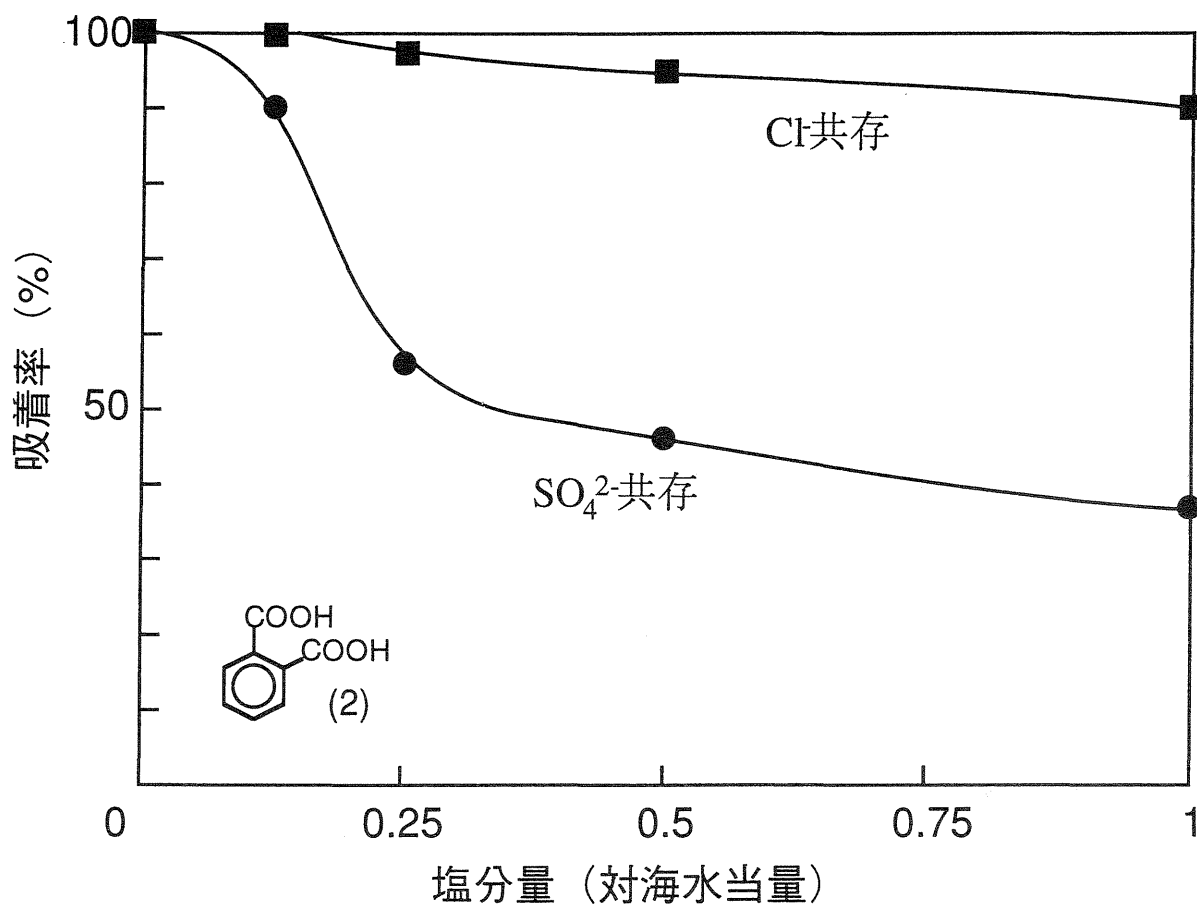


図 1 3 カルボン酸 2 の吸着に及ぼす共存塩の影響。所定の塩分量(0.25 ~ 1 海水当量)を含んだ 2 の溶液(濃度 0.1 mmol/dm³) 40 cm³に、HIO 懸濁液(Fe として 4 mg)を加え、pH 4 で 5 h 間振り混ぜた。平衡後の吸着率を塩分量に対してプロットした。

溶離率を溶離平衡時の pH に対して記点し、溶離曲線を描いた。結果を図 15 に示す。

塩共存下の条件で吸着操作を行った試料も、塩を共存させない場合と同様にその吸着は pH の変化に対して可逆であって、酸性で吸着させたカルボン酸をアルカリ溶液中で溶離回収することが可能であることが判る。また、塩共存下でフタル酸を吸着させた HIO を純水

で5回洗浄し、洗浄によるフタル酸の溶離を調べたが、溶離は認められなかった。一方、共存塩である Cl^- 、 SO_4^{2-} は、吸着、洗浄の過程でそのほとんどが脱塩され、溶離操作の際の上澄み液($\text{pH} > 7$)中濃度は、前者が $0.2 \sim 0.6 \text{ mmol/dm}^3$ 、後者は 0.1 mmol/dm^3 以下であった。これらの結果より、海水中に溶存する極低濃度のカルボン酸類を HIO に吸着捕集し、脱塩しながら濃縮を行うことが可能になった。

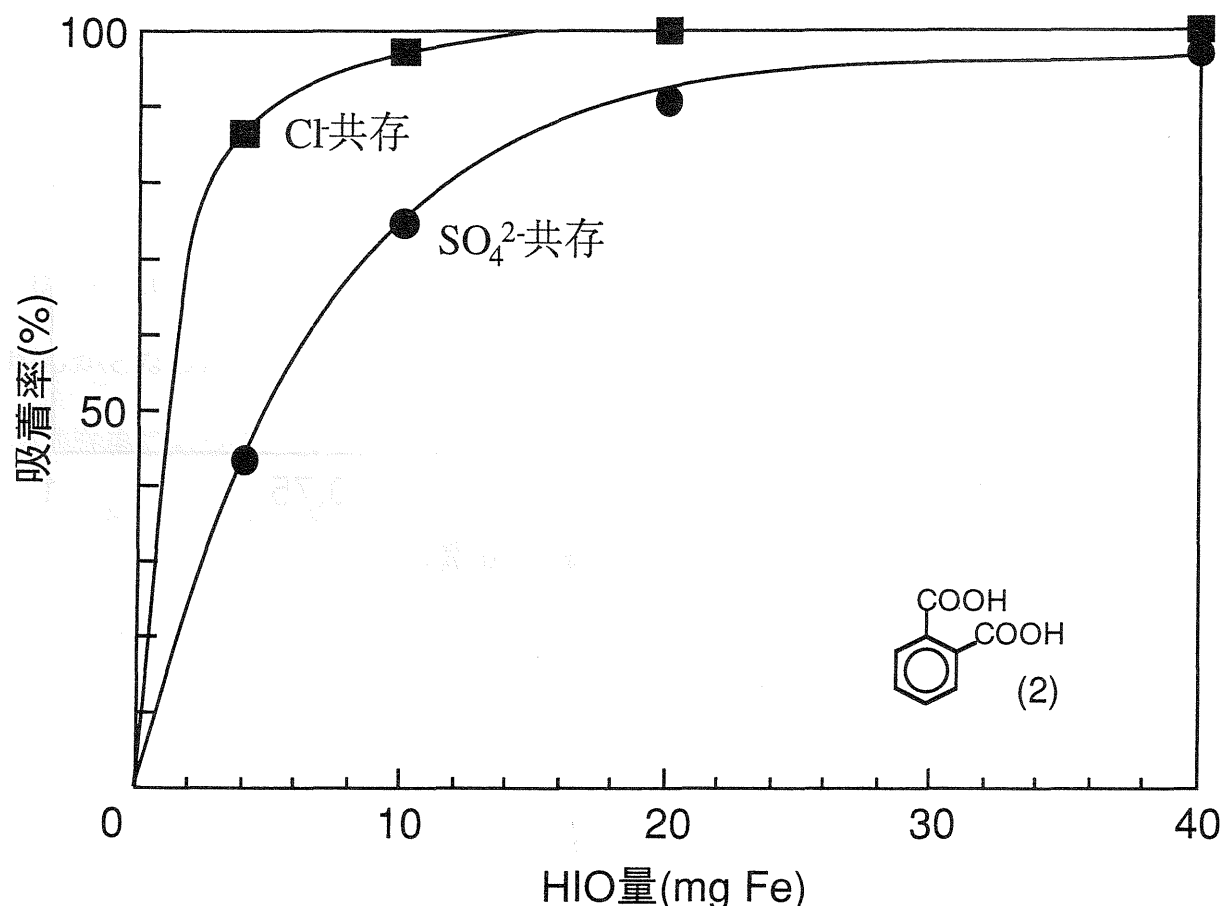


図 14 海水中からのカルボン酸 2 の吸着捕集。海水当量の塩(Cl^- 、 SO_4^{2-})を共存させた 2 の溶液(濃度 0.1 mmol/dm^3)に、HIO 懸濁液(Fe として $4 \sim 40 \text{ mg}$)を加え、 $\text{pH} 4$ で 5 h 間振り混ぜた。平衡時の吸着率を HIO の量に対してプロットした。

結 論

天然水中の微量生理活性有機化合物を捕捉し、同定が可能となる濃度まで予備濃縮する方法として、水酸化鉄 HIO への吸着現象に着目した。生理活性有機化合物のモデルには、

分子構造の相違を考慮して、34 種のカルボン酸並びにその類縁化合物を選んだ。これらの各々について吸着率-pH 曲線を描き、各分子中の HOOC -基の数と置換位置ならびに HOOC -基以外の置換基が吸着曲線におよぼす影響を系統的に比較した。その結果、

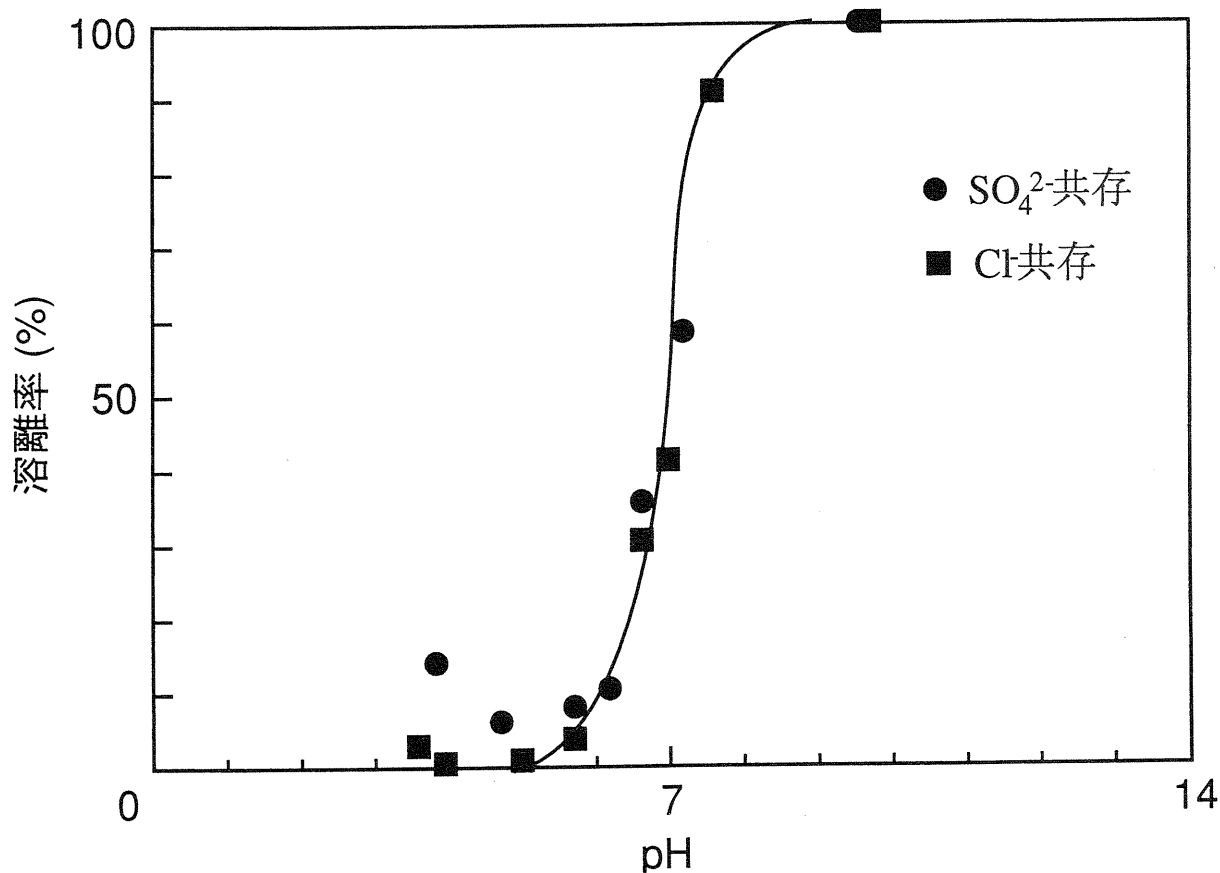


図 15 海塩共存下におけるカルボン酸 **2** の溶離曲線。海水当量の塩(Cl^- 、 SO_4^{2-})を共存させた **2** の溶液(濃度 0.1 mmol/dm^3)に、 HIO 懸濁液(Fe として 20 mg)を加え、 $\text{pH } 4$ で 5 h 間振り混ぜた。その後、遠沈法で HIO を回収し、純水 40 cm^3 を加え、 $\text{pH } 4 \sim 11$ に調整して、再度振り混ぜた。溶離してきた **2** の量の吸着量に対する割合を、平衡時の pH に対してプロットした。

(1) HOOC -基を 2 個以上有するカルボン酸は、 HOOC -基を 1 個有するモノカルボン酸より著しく吸着が促進され、 $\text{pH } 4.5 \sim 5.5$ で定量的に吸着捕集されること；(2) HOOC -基とともに HO -基が含まれていると、この化合物の吸着は促進されるが、逆に Cl -基は吸着を抑制すること；(3) いずれの場合も置換基が HOOC -基に対して近接した位置にあるとその効果は大きくなること；(4) H_2N -基による効果は芳香族カルボン酸では目立た

ないが、脂肪族では吸着を抑制すること；(5) 化合物全体についてみると、HOOC-基の酸解離定数 (pK_a) と吸着率が 50%となる pH 値 ($pH_{1/2}$) の間には、 $pH_{1/2} = -pK_a + 9$ の関係が認められる。この知見を援用すると、HIO による有機化合物捕集法の成否を予見することができること；(6) 本法は海水当量の塩が共存した場合にも HIO を増量することにより適用可能であること；が明らかとなった。

参考文献

- [1] 石橋雅義、藤永太一郎、桑本融、村井重夫、日化、**88**, 76-80 (1967).
- [2] 石橋雅義、藤永太一郎、桑本融、小山睦夫、杉林進治、日化、**81**, 392-395 (1960).
- [3] 桑本融、日化、**81**, 1669-1673 (1960).
- [4] 石橋雅義、藤永太一郎、桑本融、沢本博道、日化、**85**, 763-766 (1964).
- [5] 藤永太一郎、桑本融、村井重夫、木原壮林、中山英一郎、日化、**92**, 339-344 (1971).
- [6] 石橋雅義、藤永太一郎、桑本融、日化、**79**, 1496-1499 (1958).
- [7] 藤永太一郎、小山睦夫、伊豆津公祐、姫野貞之、川嶋宗継、日化、**95**, 1489-1493 (1974).
- [8] 石橋雅義、藤永太一郎、桑本融、荻野善紀、日化 **88**, 73-76 (1967).
- [9] 小山睦夫、日化、**82**, 72-76 (1961).
- [10] 石橋雅義、田伏正之、分析化学、**8**, 588-593 (1959).
- [11] 石橋雅義、重松恒信、化研報(京都大学)、**34**, 210-213 (1956).
- [12] 石橋雅義、藤永太一郎、日化、**73**, 783-785 (1952).
- [13] E. Nakayama, *Anal. Chim. Acta*, **131**, 247-254 (1981).
- [14] T. Hori, M. Moriguchi, M. Sasaki, S. Kitagawa, and M. Munakata, *Anal. Chim. Acta*, **173**, 299-303 (1985).
- [15] T. Hori and M. Sugiyama, *Analyst*, **117**, 893-897 (1992).

- [16] J. L. Sarmiento and U. Siegenthaler, *Nature*, **365**, 9 (1993).
- [17] 日本海洋学会: 沿岸環境調査マニュアル II (恒星社 厚生閣、1991).
- [18] K. Tanaka and J. S. Fritz, *J. Chromatogr.*, **361**, 151-160 (1986).
- [19] P. Elizabeth and K. Peter, *J. Chromatogr.*, **506**, 157-167 (1990).
- [20] S. Rolf, *J. Chromatogr.*, **251**, 339-358 (1982).
- [21] 小山忠四郎、生物地球化学 (東海大学出版会、1980).
- [22] 日本海洋学会、海と地球環境 (東京大学出版会、1990).
- [23] J. A. Davis and J. O. Leckie, *Environment. Sci. Technol.*, **12**, 1309-1315 (1978).
- [24] 石野二三枝、青木豊明、宗森信、日化、681-684 (1982).
- [25] 石野二三枝、宗森信、日化、380-384 (1983).
- [26] 青木豊明、宗森信、日化、1267-1270 (1983).
- [27] J. I. Hedges and P. E. Hare, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **51**, 255-259 (1987).
- [28] J. J. Zullig and J. W. Morse, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **52**, 1667-1678 (1988).
- [29] S. Kaneko, M. Mikawa, and S. Yamagiwa, *Chem. Lett.*, 209-212 (1989).
- [30] S. Kaneko, M. Mikawa, and S. Yamagiwa, *Colloids and Surfaces*, **46**, 203-212 (1990).
- [31] S. Kaneko, S. Ohmori, M. Mikawa, T. Yamazaki, M. Nakamura, and S. Yamagiwa, *Chem. Lett.*, 2249-2252 (1992).
- [32] M. Ogawa, M. Hirata, K. Kuroda, and C. Kato, *Chem. Lett.*, 265-268 (1992).
- [33] B. Siffert and A. Naidja, *Clay Minerals*, **27**, 109-118 (1992).
- [34] H. Yokoi, T. Tsutsui, Y. Mori, and T. Minami, *Chem. Lett.*, 2231 (1991).
- [35] S. Takahashi, *J. Biochem.*, **38**, 57 (1978).

第3章 水酸化鉄に対するリン化合物の吸着性とその予備濃縮法への応用について

(堀 智孝, 杉山雅人, 高橋弘樹)

水酸化鉄は、pH 4～8 の領域で正リン酸を定量的に吸着することが知られている。この現象は正リン酸の予備濃縮法として利用され、この手法を用いた微量リン酸の定量法が数多く開発されている。この吸着現象は、塩化ナトリウムなどの電解質の共存の効果を受けないために、高濃度の塩分を含んでいる海水試料にも適用が可能となる有利なものである[1]。水酸化マグネシウムを吸着剤とするリン酸の予備濃縮法を研究する中で、石橋と田伏は、正リン酸の他に、グリセロリン酸が部分的に吸着してくることを発見した[2]。この発見は、グリセロリン酸に類縁の有機リン酸が、水和金属酸化物を吸着剤にして、効率よく捕集できる可能性を強く示している。

本研究は、三リン酸、ピロリン酸、モノメチルリン酸、亜リン酸、 α - および β -グリセロリン酸、ジメチルリン酸、次亜リン酸を取り上げ、それぞれの水和酸化鉄への吸着率を pH の関数（以後、吸着曲線と呼ぶ）として測定したものである。その結果、ジメチルリン酸と次亜リン酸を除く総ての化合物が水和酸化鉄に吸着され、また、吸着されたものは少容量のアルカリ性水溶液中に脱離されることが解った。リン化合物の捕集法の最適条件と予備濃縮法の実例について述べる。

実 験

[試 薬]

濃度 0.001 mol/dm^3 リン酸標準溶液は、リン酸二水素カリウムの計算量を純水にとかりて調製し、ポリエチレン瓶中に保存した。同様、濃度 0.001 mol/dm^3 の三リン酸、ピロリン酸、モノメチルリン酸、亜リン酸、 α - および β -グリセロリン酸、ジメチルリン酸、次亜リン酸標準溶液は、それぞれ $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (1.4 %), $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (0.5 %), $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (< 0.1 %), $\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{Na}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3.6 %),

$\text{CH}_2(\text{OH})\text{CH}(\text{OPO}_3\text{Na}_2)\text{CH}_2\text{OH}\cdot x\text{H}_2\text{O}$ ($< 0.1\%$)、 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ ($< 0.1\%$)を水に溶解して調製した。ここで、カッコ内の数値は、各化合物に不純物として含まれていた正リン酸の含量である。いずれも、クーロメトリー法[3]で定量した結果であるが、吸着曲線を描く際には、必要に応じて不純物の正リン酸含量を補正した。また、これらの溶液の標定には、過塩素酸で灰化後生成する正リン酸に対して吸光光度法を適用した。

濃度 0.001 mol/dm^3 モノメチルリン酸とジメチルリン酸は、両者の $1:1$ 混合物を購入し、既報の方法[4]で生成したものから調製した。

次のような濃度 0.5 mol/dm^3 緩衝溶液を調整し、吸着曲線を測定する際には 0.05 mol/dm^3 に希釈し、pH 調整を行った。酢酸/酢酸ナトリウム(pH 4.0 ~ 5.9)、MES/水酸化ナトリウム(pH 6 ~ 7) [5]、HEPES/水酸化ナトリウム(pH 7.1 ~ 8.2) [5]、アンモニア/塩化アンモニウム(pH 8.3 ~ 10.2)、水酸化ナトリウム(pH 10.5 ~ 13.0)。

吸着剤となる水和酸化鉄は、塩化鉄溶液($1\text{ mg Fe}/1\text{ cm}^3$ 濃度の $1\text{ mol/dm}^3\text{ HCl}$ 溶液)の 2 cm^3 をアンモニア水溶液(2 mol/dm^3)の 2 cm^3 と混合し、生成した沈殿を純水で2回洗浄後、 2 cm^3 の純水に分散させる。この懸濁液を、試料の数だけ、毎回使用の度に新しく調製する。

[吸着曲線の測定]

容量 100 cm^3 の蓋付きバイアルに、 0.5 mol/dm^3 緩衝溶液 2 cm^3 、 0.001 mol/dm^3 リン化合物試料溶液 0.060 cm^3 (三リン酸とピロリン酸に就いては、それぞれ 0.02 と 0.03 cm^3)を取り、これに水を加えて約 80 cm^3 まで希釈する。次に、よく攪拌しながら水和酸化鉄懸濁液を加え、pH を所定の値に調整した後、全量を 100 cm^3 にする。吸着平衡に達するまで 30 min 放置し、pH を測定後、ヌクレポアフィルター(孔径 $0.4\text{ }\mu\text{m}$)で吸着剤を回収し、吸着物中のリンをリンモリブデン酸酢酸ブチル抽出法[1]で定量する。吸着前のリン量と吸着剤中のリン量から吸着率を計算し、これを平衡時の pH に対してプロットし

た。以後、この曲線を吸着曲線と呼ぶ。

結果と考察

[吸着剤の量、緩衝溶液の濃度、平衡に達するまでの時間]

正リン酸の吸着曲線を図 1 に示す。この曲線は、上述の条件下で求めたものであって、正リン酸濃度は $6 \times 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$ 、緩衝溶液濃度は 0.01 mol/dm^3 である。この曲線は、石橋と田伏が求めたもの[1]とよく一致し、正リン酸の吸着は pH 4 ~ 8 で定量的に起こっている。この曲線上で、pH 7 と pH 8 の吸着率に注目し、吸着剤の量を 0.2 ~ 5.0 mg (鉄含量)の範囲で変化させたところ、鉄含量が 1 mg 以上でリン酸の吸着は定量的になることが解った。以後の実験では、特記しない限り、安全のために 2 mg の鉄を用いることにした。

緩衝溶液 MES と HEPES の濃度をそれぞれ pH 7.0 と pH 8.0 に置いて変化させた。これらはいわゆる Good's Buffer[5]として知られるものであって、鉄に対する化学活性が低いものであるが、その濃度が 0.2 mol/dm^3 を超えると、吸着率の低下が観測された。以後の実験では、 0.01 mol/dm^3 濃度を用いることにした。

pH 7.0 において、平衡に達するまでの時間を調べたところ、10 min 以内であることが解った。また、それ以上に長く放置しても、結果に変化が無いことが解ったので、総ての吸着実験で、30 min 放置することにした。

[モノメチルリン酸、 α - および β -グリセロリン酸、亜リン酸の吸着曲線]

モノメチルリン酸の吸着曲線を図 1 に曲線 2 で示した。この曲線から解るように、モノメチルリン酸の吸着は pH 4 ~ 6.8 で定量的に起こるが、この吸着領域は正リン酸(曲線

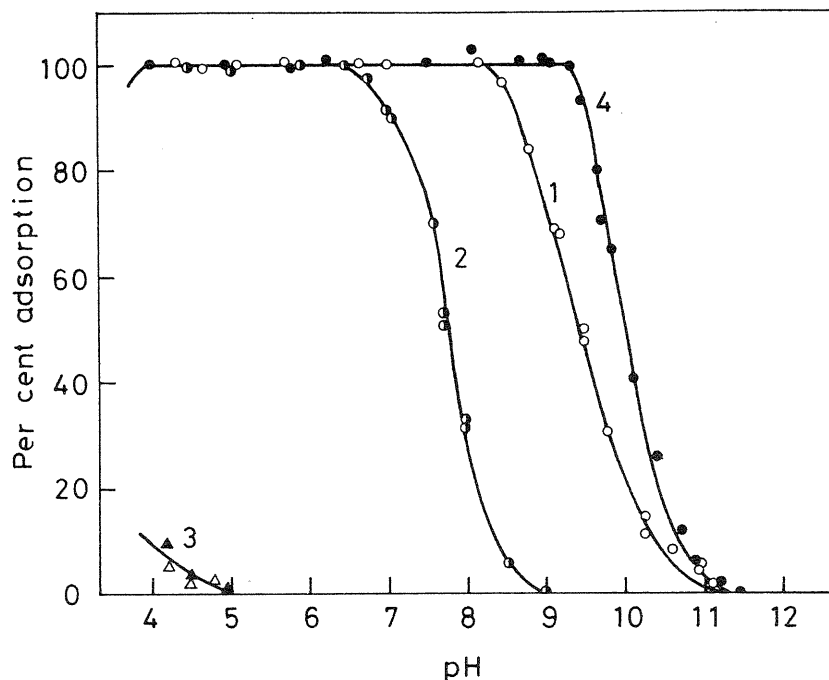


図 1 正リン酸(○)、モノメチルリン酸(●)、ジメチルリン酸(▲)、次亜リン酸(△)、ピロリン酸と三リン酸(●)の水酸化鉄に対する吸着曲線。 α -および β -グリセロリン酸と亜リン酸の吸着は図中の曲線 2 に一致する。いずれの曲線も、100 cm³ の試料溶液中から(Fe 含量として 2 mg の)水酸化鉄に吸着させたものである。

1) に比べると約 1.5 pH 分だけ酸性側に移動している。この pH の差は、正リン酸とモノメチルリン酸の分離に有効である。

同様にして、 α - および β -グリセロリン酸、亜リン酸の吸着曲線を描いたところ、これらは殆どモノメチルリン酸の曲線と一致し、図 1 の曲線 2 は、これら四者の結果を同時に示すことになる。これら 4 種のリン化合物は、置換基の種類が異なるだけではなく、亜リン酸ではリンの酸化数が他のものと違っている。それにも拘わらず吸着曲線が一致するのは、リン化合物の吸着では、リン原子の周りの P-O 結合の配置が最も重要な役割を果たしているからである。この重要性は、すでに Takeshita ら[6]に指摘されていることではあるが、水酸化鉄への吸着現象においても、この原理が成り立つことが解る。な

おまた、亜リン酸やリン酸誘導体では遊離の P-O 結合が、正リン酸に比べて 1 個少なくなるが、このことが鉄への吸着力を弱くすることに繋がり、吸着領域が 1.5 pH 分だけ狭くなる（図 1 の曲線 1 と 2 を参照）と考えるのがよい。

[ジメチルリン酸と次亜リン酸の吸着]

これらの化合物は、検討した pH 領域では、殆ど吸着されないことが解った(曲線 3)。分子中で遊離の P-O 結合がさらに 1 個少なくなつて、1 個が残るだけになったためである。鉄による吸着が起こらないという結果は、予備濃縮法は実現しないが、その他のリン化合物を pH 5 で吸着捕集した後、ジメチルリン酸や次亜リン酸並びにこれらに類縁のリン化合物を母液中に残留させて分離する点で有効に利用できる事実である。

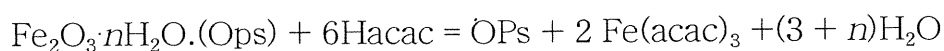
[三リン酸とピロリン酸]

これらの縮合リン酸の吸着曲線は、図 1 の曲線 4 である。この曲線は、正リン酸(曲線 1)に比べると、アルカリ側に拡がっていることが解る。分子中に遊離の P-O 結合が 3 個以上存在するからである。吸着曲線から解るように、縮合リン酸間の分離は困難であるが、鉄を用いてこれらを同時に吸着捕集するのは容易である。

[吸着捕集したリン化合物の回収と同定法]

上述のように、分子内に遊離の P-O 結合が 2 個以上存在するリン化合物は、pH 6 付近で定量的に水和酸化鉄に吸着捕集されることが解った。また、一旦捕集されたリン化合物は、母液から濾過法で分離した後、超音波を照射しながら少容量のアルカリ水と振り混ぜると、約 1 min で 90 %以上が回収できることが解った。アルカリ水には 0.01mol/dm^3 アンモニア(pH 10)を用いるが、三リン酸とピロリン酸の回収には、同濃度の水酸化ナトリウム水溶液が必要である。

リン化合物の回収と同定には、次のような原理に基づく改良法が一層有用である。



ここで、Ops: 吸着捕集されたリン化合物、 $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$: 水酸化鉄、Hacac: アセチルアセトン、 $\text{Fe}(\text{acac})_3$: アセチルアセトンの鉄錯体である。リン化合物を吸着した水酸化鉄を濾過法で回収し、濾紙から剥がれやすくなるまで約 30 min 風乾、乾燥した鉄の全量を蓋付き遠沈管に移して、アセチルアセトン 2 ml を混和する。約 1 h 後、生成した赤色錯体をトルエンで抽出除去すると、遠沈管の下方に約 1.5 cm³ の水相が生じ、この中にリン化合物が遊離してくる。水相は、最後にクロロホルムで洗浄し、水相の全量を 2 cm³ としたのち、HPLC に供試して、リン化合物の分離と同定を行う。

以上の方法は、モノメチルリン酸、亜リン酸、グリセロリン酸の他、モノメチルホスホン酸、ホスホリルエタノールアミン、2-アミノエチルホスホン酸、1-アミノエチルホスホン酸、フルクトース-1-リン酸、フルクトース-6-リン酸、グルコース-1-リン酸、フルクトース-1,6-ジリン酸、ホスホセリン、ホスホスレオニン、AMP、ADP、ATP の捕集と同定に適用可能であることを確かめた。

結 論

リン化合物として、正リン酸、三リン酸、ピロリン酸、モノメチルリン酸、亜リン酸、 α - および β -グリセロリン酸、ジメチルリン酸、次亜リン酸を取り上げ、それぞれの水酸化鉄への吸着曲線を測定した。正リン酸は pH 4.0 ~ 8.0 で、三リン酸とピロリン酸は pH 4 ~ 9.3 で、その次の四者は pH 4 ~ 8.0 で、水和酸化鉄に定量的に吸着することが解った。最後の二者は、どの pH 領域でも殆ど吸着されることは無かった。モノメチルリン酸ならびに α - および β -グリセロリン酸は、各種有機リン酸を代表するものであるから、これに類縁のリン化合物がこの吸着手法で濃縮が可能であると考えた。

引用文献

- [1] 石橋雅義、田伏正之、分析化学、**8**, 588 (1959).
- [2] 石橋雅義、田伏正之、分析化学、**6**, 7 (1957).
- [3] T. Hori and T. Fujinaga, *Talanta*, **30**, 925 (1983).
- [4] T. Hori, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **39**, 2173 (1977).
- [5] N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa, and R. M. M. Singh, *Biochem.* **5**, 467 (1966).
- [6] R. Takeshi, I. Yoshida, and K. Ueno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **52**, 2577 (1979).

第4章 水酸化鉄とケイ酸ゲル複合体を捕集剤とするリン酸の吸着捕集法とリンの高感度吸光光度定量法

(長井正博, 杉山雅人, 堀 智孝)

生物の繁殖と成長に必須の物質であるリン酸は、河川、湖沼、海洋といった水圏の特質を支配する要因の一角をなして、リン酸の分析法を感度、精度の点で改良し、併せて操作を簡便にすることが、湖沼学、海洋学、環境化学を始めとする諸分野で強く望まれている。この要求に応えるものとして、現在、いくつかの標準法が知られている。その代表的なものは Murphy and Riley によるアンチモン共存下のモリブデン青色法[1]であって、この方法は海水にとどまらず湖沼水[2]、上下水の水質評価[3]にも適用されている。また、この方法は感度と精度に優れていて（定量下限： $0.3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ ； $7 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ における相対標準偏差：2%）、フローインジェクション法による自動分析も可能である[4]。

他方、これとならんで、天然水中のリン酸を定量するに当たってその感度をさらに1ないし2桁増大することが望まれている。河川の源流域、夏季成層期における湖沼の表層部、あるいは遠洋海域の表層部で採取される多くの天然水試料においてリン酸の溶存量が旧来の方法の定量下限を大きく下回るためである。

天然水中のリン酸を高感度で定量するための提案は古くからなされている。例えば、石橋と田伏は水和酸化鉄を吸着剤に用いたリン酸の濃縮法とリンモリブデン酸の酢酸-n-ブチル溶媒への溶媒抽出法を併用し、海水中の $0.05 \sim 0.1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ リン酸を定量した[3]。また、堀らは、リンモリブデン酸をメチルイソブチルケトン-シクロヘキサン混合溶媒に抽出した後、有機溶媒中のモリブデンをピロカテコールバイオレットにより定量するという間接法を提案し、定量下限を $0.02 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ まで改善した[6]。本水らは新しい原理による高感度化をはかっている。彼らは $5 \sim 100 \text{ cm}^3$ の試水中で生成されたリンモリブデン酸をエチルバイオレット[7]やマラカイトグリーン[8]といった陽イオン性色素とのイオン

会合体として有機溶媒に抽出し、抽出物の吸光度から、 $0.003 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ を下限とするリン酸の分析に成功している。

本研究では水中のリン酸が、少量の Fe^{3+} を共存させると、縮合ケイ酸に捕集される現象を見出した。条件を最適にすると、 $0.1 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ Fe 共存下、pH 5.5 ~ 6 でリン酸が縮合ケイ酸に定量的に捕集され、湖水や海水といった天然水中のリン酸の捕集法として効果が高いことがわかった。この予備濃縮法にピロカテコールバイオレット法あるいはモリブデン青色法を併用すると、 $0.002 \sim 2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (原水換算) のリン酸が定量できることがわかった。

実 験

[試 薬]

Murphy and Riley[1]に従って $6 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ 酒石酸アンチモニルカリウム水溶液、 $0.1 \text{ mol}/\text{dm}^3$ アスコルビン酸水溶液を、また堀ら[6]に従って 11 : 9 (v/v) メチルイソブチルケトン-シクロヘキサン混合溶媒、0.2 % ピロカテコールバイオレット水溶液、0.5 % カプリコート - エタノール溶液を調製した。

その他、 $0.12 \text{ mol}/\text{dm}^3$ モリブデン酸ナトリウム水溶液、 $0.1000 \text{ mol}/\text{dm}^3$ リン酸標準水溶液、 $0.1 \text{ mol}/\text{dm}^3$ 塩化鉄水溶液を用いた。また、Lyman and Fleming[9]に従って人工海水を調製した。

縮合ケイ酸分散液は次の方法で調製した。蒸留水 40 cm^3 に $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (7.10 g, 25 mol) を溶解し、よく攪拌しながら conc. HCl (5 cm^3 , 59 mmol) を一気に混和し、これに激しく攪拌しながら NaOH 溶液を滴下し、pH を 8 まで徐々に上昇させた。pH の上昇と共に溶液は次第に粘度を増して糊状になる。これを遠沈法で回収し、蒸留水で 5 回洗浄した後、蒸留水に分散させ、その全量を 50 cm^3 とした。リン酸試料 1 件当たり、こ

の分散液の 1cm^3 を用いる。また以下の議論では Na_2SiO_3 から調製したこの縮合ケイ酸吸着剤を [Si] と表記する

[標準操作法]

天然水中に含まれるリン酸を Fe^{3+} の共存下で [Si] に捕集する。この捕集物中の Fe^{3+} は低く抑えられているので、モリブデン青色法[1]あるいはピロカテコールバイオレット法[6]の適用が可能となり、リン酸の優れた定量法が実現する。標準操作法は以下のようである。

(i) 前濃縮：試水 1 l (pH 5.4~ 6.2) に 0.1 mmol/dm^3 FeCl_3 溶液 0.1 cm^3 と [Si] 懸濁液 1 cm^3 を加えてよく攪拌する。1h 後、沈殿をヌクレポアフィルター上に回収し、次に共栓付き遠心管 (50 cm^3 容) を受器として、沈殿に加温した 4 mol/dm^3 HCl 3.5 cm^3 を注いで溶解する。ろ液と沈殿物の洗液を合一し、その全量を水で 35 cm^3 とする。この試料に対して次の (ii) または (iii) を実施する。

(ii) モリブデン青色法 ($0.02\sim 2\text{ }\mu\text{mol/dm}^3$ のリン酸に適用)：前記 (i) の試料 35 cm^3 の中から 5 cm^3 を分取し、 6 mmol/dm^3 酒石酸アンチモニルカリウム 0.05 cm^3 、 0.12 mol/dm^3 モリブデン酸ナトリウム 0.2 cm^3 をこの順に混和し、 0.1 mol/dm^3 アスコルビン酸 0.3 cm^3 を加え、20 分後の 885 nm における吸光度を測定する。

(iii) ピロカテコールバイオレット法 ($0.002\sim 0.02\text{ }\mu\text{mol/dm}^3$ のリン酸に適用)：前記 (i) の試料中から 30 cm^3 を分取し、 4 mol/dm^3 HCl 2.5 cm^3 と 0.12 mol/dm^3 モリブデン酸ナトリウム 3.5 cm^3 を混和し、生成したリンモリブデン酸を 11 : 9 (v/v) メチルイソブチルケトン-シクロヘキサン混合溶媒 7 cm^3 と共に 5 min 間激しく振とうして抽出し、分層後、有機層の 5 cm^3 を共栓付遠心管 (10 ml 容) に分取する。この試料に 0.1 mol/dm^3 NaOH 2.5 cm^3 を加えて 1 分間振とうし、 2.5 mol/dm^3 HCl 1.5 cm^3 、0.2 % ピロカテコールバイオレット 0.5 cm^3 、0.5 % カプリコート 0.5 cm^3 を加えて再び 1min

間振とうする。分層後、有機層の 545 nm での吸光度を測定する。

考 察

[リン酸の吸着曲線]

図 1 a の曲線 1 は、吸着剤 [Si] に対するリン酸の吸着曲線を Fe^{3+} の共存下で描いたものである。この吸着曲線は二つの極大を示した。すなわち、吸着率は pH 3 から増加し始め、pH 5.4 ~ 6.2 で最大一定値となった後、pH 6.5 で 80 % まで一旦減少し、pH 6.5 を越えると再び増加し、pH 8 で第二の極大値を示した。

比較のために、 Fe^{3+} を共存させないで、[Si] そのものに対するリン酸の吸着曲線を調べたが、[Si] のみではリン酸は吸着しなかった。次に、 Fe^{3+} のみでリン酸の吸着を調べた (曲線 2)。この曲線の吸着率は、pH 3 ~ 6.2 においては 20 % と低かったが、pH 7 を越えると増加し、pH 8 で極大を示した。この吸着曲線は pH 7 ~ 10 の領域において、曲線 1 とよく似ている。このことは、pH 7 ~ 10 でのリン酸の吸着は水酸化鉄そのものによるものであるが、pH 5.4 ~ 6.2 での吸着は Fe^{3+} と [Si] が共存して始めて現れるものであることを示している。

同様の吸着曲線を人工海水中で求めたところ、図 2 に示すように、 Fe^{3+} 共存下での [Si] に対するリン酸の吸着捕集は海水中でも有効であることがわかった。図 2 の曲線 1 は、海水中のリン酸が pH 5.4 ~ 7.4 で定量的に吸着することを示している。この pH 領域は先に述べた淡水中の領域より広いこともわかる。なお、比較のために、 Fe^{3+} のみによる海水中の吸着曲線を図 2 の曲線 2 に示した。淡水の場合と同様に pH 8 に吸着の極大が現れる。

以上のように、少量の Fe^{3+} 共存下で [Si] を捕集剤として用いると、リン酸の定量的な吸着が淡水、海水のいずれにおいても pH 5.4 ~ 6.2 の比較的広い pH 領域で実現するよ

うになる。

[リン酸の脱離曲線]

Fe^{3+} 共存下で [Si] に捕集したリン酸の脱離曲線を図 3 に示し、吸着曲線に重ねて比較した。リン酸の吸着と脱離は pH に関して不可逆であって、脱離にはやや強い酸性条件が必要となるが、図に示すようにリン酸は pH 1 以下の水中に定量的に脱離される。

[リン酸の吸着形態]

図 1b はリン酸と鉄(III)のそれぞれの溶存形態を pH の関数として描いたものである。

リン酸の溶存形態(H_3PO_4 、 H_2PO_4^- 、 HPO_4^{2-} 、 PO_4^{3-})と鉄(III)の溶存形態(Fe^{3+} 、 FeOH^{2+} 、 $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ 、 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 、 $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$)の組合せのうち、双方において優占種となる組合せは、

(i) $\text{pH} < 2.2$ で H_3PO_4 と Fe^{3+} (それぞれ曲線 1 と 5 で示される)、(ii) $\text{pH} = 2.2 \sim 3.5$ で H_2PO_4^- と FeOH^{2+} (曲線 2 と 6)、(iii) $\text{pH} = 3.5 \sim 6.3$ で H_2PO_4^- と $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ (曲線 2 と 7)、(iv) $\text{pH} = 6.3 \sim 7.2$ で H_2PO_4^- と $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{aq})$ (曲線 2 と 8)、(v) $\text{pH} = 7.2 \sim 9.6$ で HPO_4^{2-} と $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{aq})$ (曲線 3 と 8)、(vi) $\text{pH} = 7.2 \sim 9.6$ で HPO_4^{2-} と $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$ (曲線 3 と 9) である。先述したように Fe^{3+} 共存下で [Si] にリン酸が吸着する pH 領域、特にその吸着が 50 %以上である pH 領域は pH 4 ~ 6.5 であった (図 1a の曲線 1)。この pH 領域で相互作用するリン酸と鉄(III)の溶存形態は上述 (iii) の組合せ、すなわち、 H_2PO_4^- と $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ である。そして、その反応生成物は $\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{Fe}(\text{OH})_2$ あるいは FePO_4 と考えてよい。この生成物は中性種であり、リン酸と鉄(III)が高濃度に存在するときは溶解度積を優に超えて沈殿が生ずるが、これら二者が極低濃度で溶解度積以下になるとほとんど沈殿しなくなる。この溶解度積以下の状態に第三の成分として新たに [Si] が共存すると、これに FePO_4 が捕集されると考えてよい。実際、リン酸と鉄(III)と [Si] の混合系では、

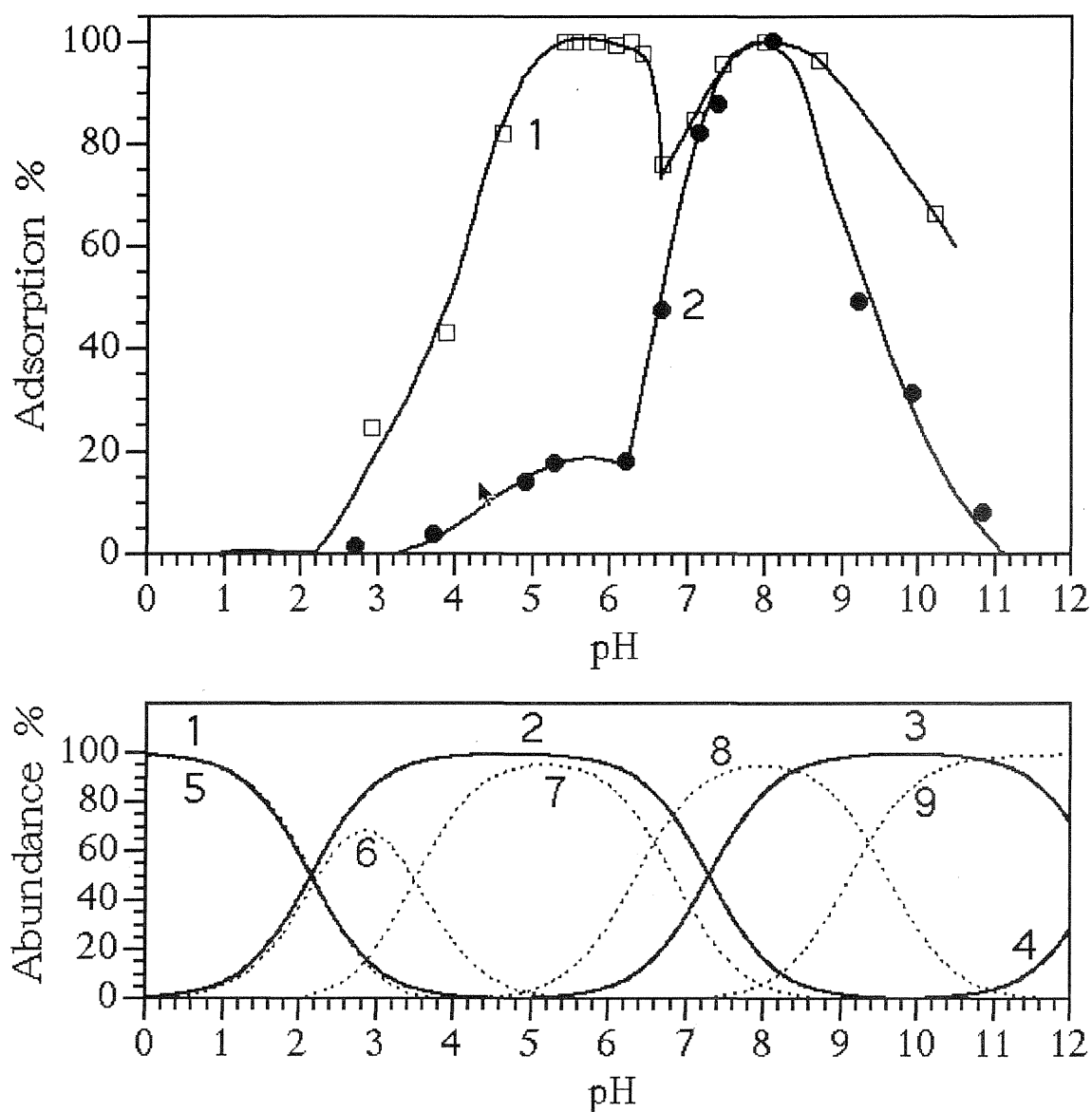


図 1 (a) Fe^{3+} 共存下の $[\text{Si}]$ に対するリン酸の吸着曲線。 FeCl_3 溶液 ($10 \mu \text{mol/dm}^3$) 中でリン酸 ($0.02 \mu \text{mol/dm}^3$) の吸着曲線を溶液に $[\text{Si}]$ を加えた場合 (曲線 1) と加えない場合 (曲線 2) で調べた。

(b) リン酸と鉄 (III) の溶存化学種の存在度曲線。水溶液中に溶存しているリン酸の化学種 (1: H_3PO_4 , 2: H_2PO_4^- , 3: HPO_4^{2-} , 4: PO_4^{3-}) の存在度曲線 (実線) と鉄 (III) の化学種 (5: Fe^{3+} , 6: FeOH^{2+} , 7: $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, 8: $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{aq})$, 9: $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$) の存在度曲線 (破線) を平衡計算により求めた。計算に用いた平衡定数は H_3PO_4 については $\log K_{a1} = -2.2$, $\log K_{a2} = -7.2$, $\log K_{a3} = -12.3$ で、 Fe^{3+} については $\log K_{a1} = -2.19$, $\log K_{a2} = -3.48$, $\log K_{a3} = -6.33$, $\log K_{a4} = -9.6$ である[文献 10]。

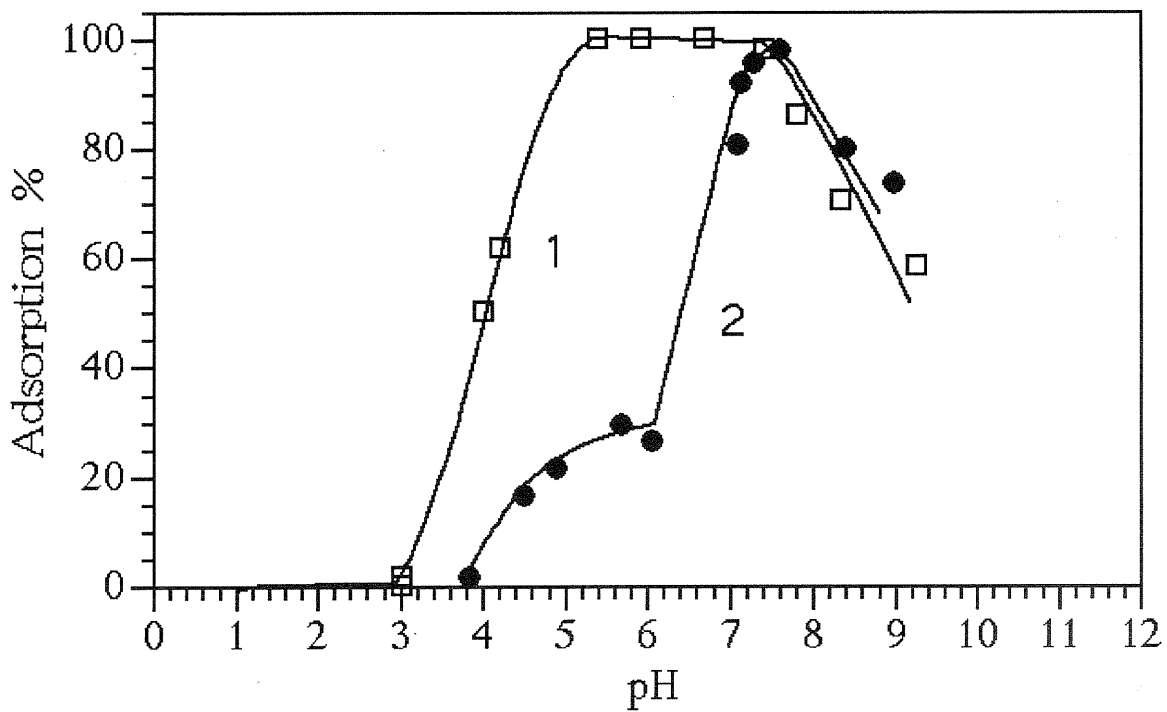


図 2 海水中における、 Fe^{3+} 共存下の $[\text{Si}]$ に対するリン酸の吸着曲線

Fe^{3+} ($10 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) 共存下、人工海水中でのリン酸 ($0.02 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) の吸着曲線を、 $[\text{Si}]$ を加えた場合 (曲線 1) と加えない場合 (曲線 2) で調べた。

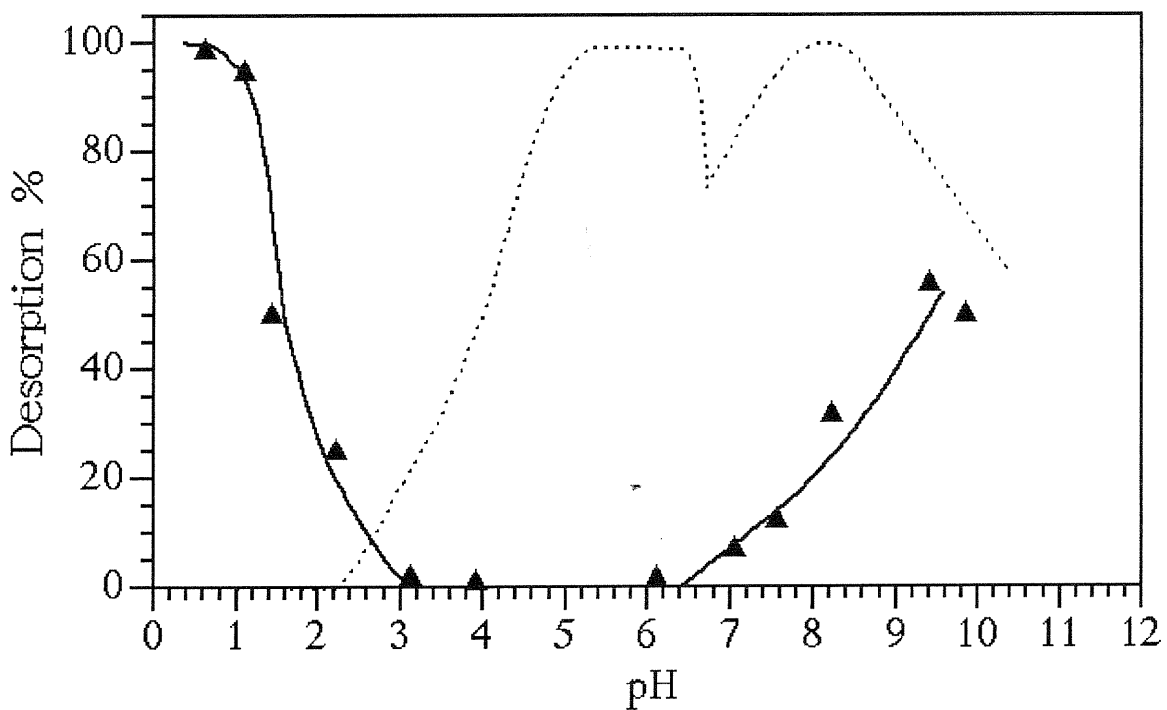


図 3 Fe^{3+} 共存下の $[\text{Si}]$ に対するリン酸の脱離曲線。 $[\text{Si}]$ へ Fe^{3+} ($10 \mu\text{mol}$) とともに吸着したリン酸 ($2 \mu\text{mol}$) の脱離曲線を調べた (実線)。また、吸着曲線を破線で重ねた。

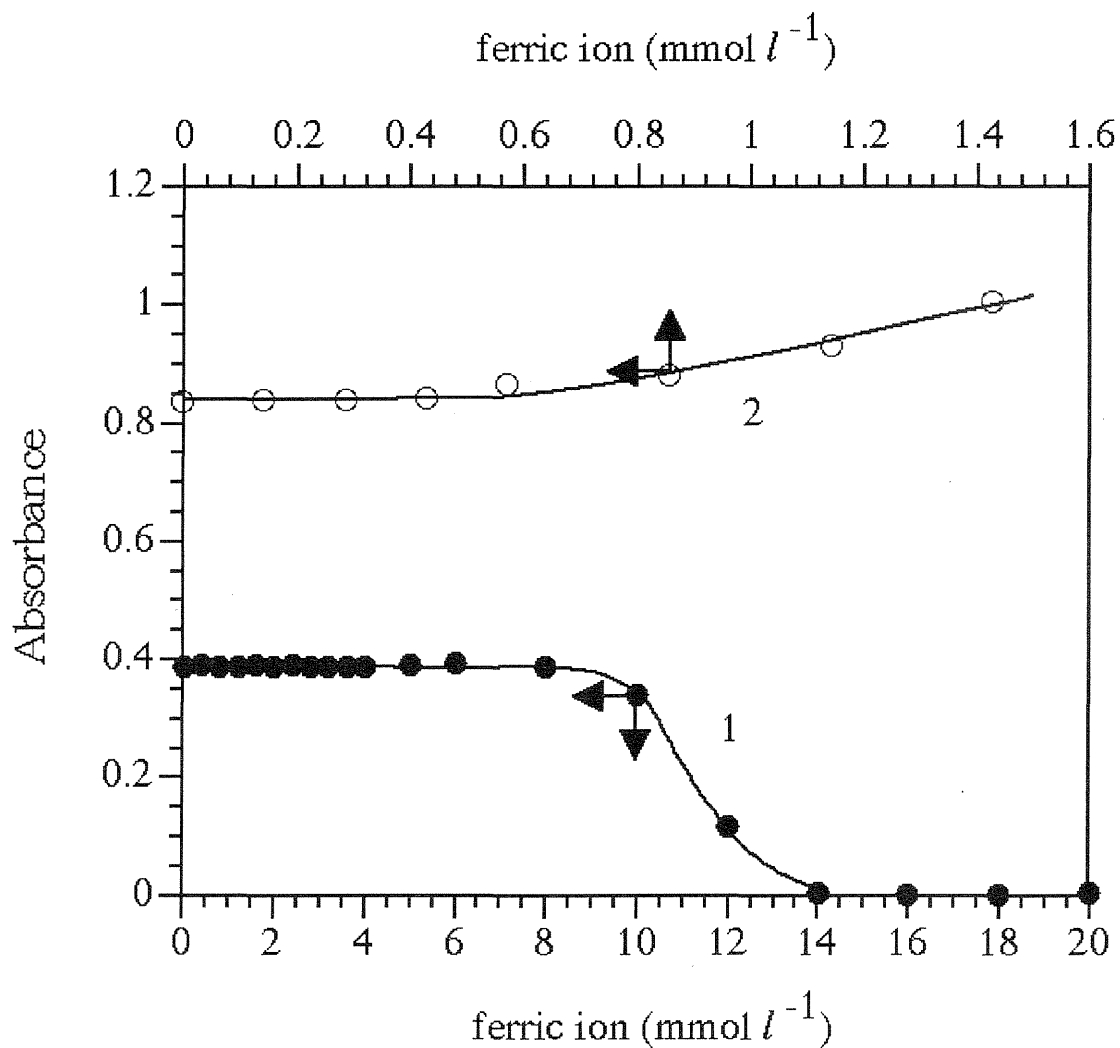


図 4 モリブデン青色法とピロカテコールバイオレット法に及およぼす Fe^{3+} の影響

リン濃度を一定 ($10 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) に保ち、鉄濃度を $0 \sim 20 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ の範囲で変化させてモリブデン青色法を実施し、 885 nm の吸光度を鉄濃度に対してプロットした (曲線 1)。また、リン濃度一定 ($0.285 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) の下で、鉄濃度を $0 \sim 1.43 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ の範囲で変化させてピロカテコールバイオレット法を実施し、 545 nm の吸光度を鉄濃度に対してプロットした (曲線 2)。

pH = 5.4 ~ 6.2 の領域でリン酸の吸着が顕著に見られる事実 (図 1 a の曲線 1) とよく一致する。

なお、pH = 6.5 ~ 9 の領域で優占種となるリン酸と鉄(III)の組合せは、上述 (iv) と (v)、すなわち H_2PO_4^- と $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{aq})$ 並びに HPO_4^{2-} と $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{aq})$ の組み合わせである。このことは水酸化鉄に吸着するリン酸の形態が H_2PO_4^- と HPO_4^{2-} であることも併せて示唆している。

[リン酸定量に対する Fe^{3+} の影響]

リン酸濃度を一定に保ち、 Fe^{3+} 濃度を変化させた試料について、モリブデン青色法及びピロカテコールバイオレット法を実施した結果、前者の定量法では $\text{Fe}^{3+} \geq 10 \text{ mmol/dm}^3$ で負の誤差が、後者では $\text{Fe}^{3+} \geq 0.5 \text{ mmol/dm}^3$ で正の誤差が認められた。標準操作法の (i) において得る、濃縮後の試料中の Fe^{3+} 濃度を 0.29 mmol/dm^3 のように低くするのは、 Fe^{3+} の妨害を受けることなく、高感度のモリブデン青色法またはピロカテコールバイオレット法を実施するためであって、 Fe^{3+} と [Si] 吸着剤の混合系を用いることによって本定量法が理想的な形で実現することがわかる。

結 論

天然水中に含まれるリン酸 ($0.002 \sim 2 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$) を少量 ($10 \text{ } \mu\text{mol}$) の Fe^{3+} とともに縮合ケイ酸上に捕集する。この捕集物中の Fe^{3+} は低く抑えられているので、モリブデン青色法あるいはピロカテコールバイオレット法の適用が可能となり、リン酸の優れた定量法が実現する。琵琶湖北湖 (水深 73 m、1999 年 12 月採取) および和歌山県田辺湾 (水深 30 m、1999 年 8 月採取) の表層水のそれぞれについて、2 件ずつ、上記 (iii) ピロカテコールバイオレット法で定量した。琵琶湖水と海水中のリン酸濃度は、それぞれ 0.00368

$\pm 0.00001 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, $0.00431 \pm 0.00001 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ であった。

参考文献

- [1] J. Murphy and J. P. Riley, *Anal. Chim. Acta*, **27**, 31 (1963).
- [2] K. Nozaki, T. Takahashi, M. Sasaki, Y. Watanabe, and N. Nakamoto, *Ann. Environ. Sci., Shinshu Univ.*, **17**, 63 (1995).
- [3] L. S. Clesceri, A. E. Greenberg, and R. R. Trussell, "Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater", 1989, American Public Health Association, Washington.
- [4] A. Henriksen, *Analyst*, **91**, 652 (1966).
- [5] M. Ishibashi and M. Tabushi, *Japan Analyst*, **8**, 588 (1959).
- [6] T. Hori, Y. Kanada, and T. Fujinaga, *Bunseki Kagaku*, **31**, 592 (1982).
- [7] S. Motomizu, T. Wakimoto, and K. Toei, *Anal. Chim. Acta*, **138**, 329 (1982).
- [8] S. Motomizu, T. Wakimoto, and K. Toei, *Talanta*, **31**, 235 (1984).
- [9] J. Lyman and R. H. Fleming, *J. Mar. Res.*, **3**, 134 (1940).
- [10] W. Stumm and J. J. Morgan, "Aquatic Chemistry", 1981, John Wiley & Sons.